

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 01 March 1999 (01.03.99)	
International application No. PCT/JP98/02927	Applicant's or agent's file reference NH-6-PCT
International filing date (day/month/year) 30 June 1998 (30.06.98)	Priority date (day/month/year) 14 July 1997 (14.07.97)
Applicant MURAKAMI, Hiroshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

05 February 1999 (05.02.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer K. Takeda Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 13 AUG 1999

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 NH-6-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/02927	国際出願日 (日.月.年) 30.06.98	優先日 (日.月.年) 14.07.97
国際特許分類(IPC) Int. Cl. ° A01K 67/027		
出願人(氏名又は名称) 日本ハム株式会社		


1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 05.02.99	国際予備審査報告を作成した日 28.07.99	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 長 井 啓 子 	2 B 9 1 2 3
電話番号 03-3581-1101 内線 3237		

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	2 - 5	有
	請求の範囲	1, 6, 7	無
進歩性 (IS)	請求の範囲	5	有
	請求の範囲	1 - 4, 6, 7	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 7	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

(1) 請求の範囲1, 6及び7について新規性が無いとする理由

国際調査報告で引用した文献1（岡部勝「ヒト補体制御因子を発現したトランスジェニックマウスの開発—異種移植、ウイルスレセプター、生殖免疫に共通する実験モデルの作成—（課題番号06454718）」第1～53頁，平成7年度科学研究費補助金（一般研究（B））研究成果報告書，平成8年3月）の第6～7頁には，異種移植の際の補体制御因子の反応をみるために SR alpha promoter や beta-actin promoter の下流にヒトDAF/CD55遺伝子を有する外来遺伝子を導入したトランスジェニックマウス、及びそれらのトランスジェニックマウスの T cell や B cell においてヒトDAF/CD55遺伝子が発現していることが記載されている。

また、国際調査報告で引用した文献2（林衆治「かなえ医学奨励金かなえ医学助成金受賞者研究業績集」第23巻，第341～355頁（1996））の第342頁には，ヒトDAF/CD55及びHRF20遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが記載されている。

上記文献1及び文献2に記載されたトランスジェニックマウスは請求の範囲1, 6及び7に記載されたトランスジェニック哺乳動物の範疇に属するものである。

(2) 請求の範囲2及び3について進歩性が無いとする理由

哺乳動物において補体制御因子DAF/CD55が血管内皮細胞に存在することは広く知られている。また、上記文献2の第342頁にはヒトDAF/CD55遺伝子を異種血管内皮細胞に対して遺伝子導入したところ異種免疫反応が著明に抑制されたというin vitroの実験結果が記載されている。

トランスジェニック非ヒト哺乳動物においてヒトDAF/CD55が補体制御因子としての作用を奏するためにはヒトDAF/CD55遺伝子が血管内皮細胞で発現する必要があるということは、上記周知事項や文献2の記載から当業者であれば当然気づくことである。血管内皮細胞特異的プロモーターが既に知られているので（例えば、JP, 7-289263, A（第一製薬株式会社）7.11月.1995（07.11.95））、それらのプロモーターを使用してヒトDAF/CD55遺伝子を血管内皮細胞において発現するようなトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作成することは、上記文献1又は上記文献2に基づいて当業者が容易に推考し得る程度のことである。

(3) 請求の範囲4について進歩性が無いとする理由

上記文献1の第8頁にはトランスジェニックマウスにおいてヒトMCPプロモーターによってヒトMCP遺伝子を発現させることを試みつつある旨が記載されている。また、上記（2）で指摘したとおり、ヒトDAF/CD55遺伝子がトランスジェニック非ヒト

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

ク非ヒト哺乳動物において補体制御因子としての作用を奏するためには、ヒトDAF/CD55遺伝子が血管内皮細胞で発現する必要があるということ、及びその際にホスト哺乳動物の補体制御因子のプロモーターを使用すればよい結果が得られるであろうことは、上記周知事項や文献2の記載から当業者であれば当然気づくことである。してみれば、ブタ補体制御因子プロモーターを採用することは上記文献1又は上記文献2に基づいて当業者が容易に推考し得る程度のことである。

(4) 請求項5について新規性及び進歩性が有るとする理由
配列番号1に示される塩基配列を有するブタ補体制御因子プロモーター、及びそれに相同性の高い補体制御因子プロモーターは、本願優先日以前に公知になっていない。よって、該ブタ補体制御因子プロモーターを使用してトランスジェニック哺乳動物を作成することに新規性及び進歩性が有る。

09/14/98
Translation
5060

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference NH-6-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP98/02927	International filing date (day/month/year) 30 June 1998 (30.06.1998)	Priority date (day/month/year) 14 July 1997 (14.07.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/027		
Applicant NIPPON MEAT PACKERS, INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).	
These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05 February 1999 (05.02.1999)	Date of completion of this report 28 July 1999 (28.07.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No.	Authorized officer Telephone No. (81-3) 3581 1101

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/02927

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 98/02927

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-5	YES
	Claims	1, 6, 7	NO
Inventive step (IS)	Claims	5	YES
	Claims	1-4, 6, 7	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

(1) The reason that Claims 1 and 6 are not novel

Document 1 cited in the international search report (Masaru Okabe, "Development of transgenic mice expressing human complement control factor - Creation of experimental models applicable to xenografting, virus receptors and reproductive immunity" (Project No. 06454718), 1995 Research Grants (General Research (B). Report of Research Results, March 1996) pp. 1-53 [in Japanese]), on pages 6-7, describes transgenic mice in which an external gene with the human DAF/CD55 gene was introduced downstream of the SR alpha promoter or beta-actin promoter in order to obtain reaction of the complement control factor during heterografting; and it mentions that the human DAF/CD55 gene was expressed in T cells or B cells of the transgenic mice.

And Document 2 cited in the international search report (Shuji Hayashi, "Collected Results of Research Aided by Kanae Subsidies for Medicine and Kanae Medical Grants", Vol. 23, pp. 341-355 (1996) [in Japanese]) on page 342, describes transgenic mice incorporating the human DAF/CD55 and HR20 genes.

The transgenic mice described in Document 1 and Document 2 above come into the category of transgenic mammals described in Claims 1, 6 and 7.

- (2) The reason that Claims 2 and 5 do not involve an inventive step.

It is widely known that in mammals the complement control gene DAF/CD55 is present in vascular endothelial cells. Document 2, page 342, also reports the results of an *in vitro* experiment in which the introduction of the human DAF/CD55 gene into the genetic material of vascular endothelial of a different species considerably suppressed heterologous immunity.

The necessity of expressing human DAF/CD55 in vascular endothelial cells in order for human DAF/CD55 to act as a complement control factor in transgenic non-human mammals is something that a person skilled in the art would naturally consider, based on the common knowledge referred to above, and on the account of Document 2. A specific vascular endothelial cell promoter is already known (e.g. JP, 7-289263, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), November 7, 1995 (07.11.95)), and it would be easy for a person skilled in the art, in the light of Document 1 or Document 2, to conceive of using this promoter to create a transgenic non-human mammal in which the human DAF/CD55 gene is expressed in vascular endothelial cells.

- (3) The reason the Claim 4 does not involve an inventive step.

Document 1, page 8, mentions attempts to express the human MCP gene in transgenic mice by means of a human MCP promoter. Similarly, as pointed out in (2) above, the necessity of expressing human DAF/CD55 in vascular endothelial cells in order for human DAF/CD55 to act as a complement control factor in non-human mammals, and the probability of getting better results by using a promoter for the complement control factor of the host mammal in this process, are aspects that a person skilled in the art

7

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference

(if desired) (12 characters maximum)

NH-6-PCT

Box No. I	TITLE OF INVENTION TRANSGENIC MAMMALS	
Box No. II	APPLICANT	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.) Nippon Meat Packers, Inc. 6-14, Minamihonmachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0054 Japan		<input type="checkbox"/> This person is also inventor. Telephone No. Facsimile No. Teleprinter No.
State (i.e. country) of nationality: JAPAN		State (i.e. country) of residence: JAPAN
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box		
Box No. III	FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.) MURAKAMI Hiroshi c/o Nippon Meat Packers, Inc., Research and Development Center, 3, Midorigahara 3-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-2646 Japan		This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)
State (i.e. country) of nationality: JAPAN		State (i.e. country) of residence: JAPAN
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box		
<input checked="" type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.		
Box No. IV	AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:		<input checked="" type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) 8548 Patent Attorney HIROSE Takayoshi Takahashi Bldg. Kita-sangokan 6th floor, 13-3, Nishitenma 5-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-0047 Japan		Telephone No. 06-315-8021 Facsimile No. 06-315-8025 Teleprinter No.
<input type="checkbox"/> Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.		

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTORS	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.</i>	
<p>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>FUJIMURA Tatsuya c/o Nippon Meat Packers, Inc., Research and Development Center, 3, Midorigahara 3-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-2646 Japan</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)</p>
State (i.e. country) of nationality: JAPAN	State (i.e. country) of residence: JAPAN
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>TAKAHAGI Yoichi c/o Nippon Meat Packers, Inc., Research and Development Center, 3, Midorigahara 3-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-2646 Japan</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)</p>
State (i.e. country) of nationality: JAPAN	State (i.e. country) of residence: JAPAN
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>TOYOMURA Koji c/o Nippon Meat Packers, Inc., Research and Development Center, 3, Midorigahara 3-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-2646 Japan</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)</p>
State (i.e. country) of nationality: JAPAN	State (i.e. country) of residence: JAPAN
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p>Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)</p> <p>SHIGEHISA Tamotsu c/o Nippon Meat Packers, Inc., Research and Development Center, 3, Midorigahara 3-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-2646 Japan</p>	<p>This person is:</p> <p><input type="checkbox"/> applicant only</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)</p>
State (i.e. country) of nationality: JAPAN	State (i.e. country) of residence: JAPAN
<p>This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box</p>	
<p><input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.</p>	

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | <input type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> NO Norway |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PL Poland |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RO Romania |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IS Iceland | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input type="checkbox"/> JP Japan | |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

- ☐
- ☐
- ☐

In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) of

The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIMFurther priority claims are indicated in the Supplemental Box ☐

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Country (in which, or for which, the application was filed)	Filing Date (day/month/year)	Application No.	Office of filing (only for regional or international application)
item (1) Japan	14.07.97	Patent Application 9-205235	
item (2)			
item (3)			

Mark the following check-box if the certified copy of the earlier application is to be issued by the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office (a fee may be required):

☐ The receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s) : _____**Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**Choice of International Searching Authority (ISA) (If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / JP

Earlier search Fill in where a search (international, international-type or other) by the International Searching Authority has already been carried out or requested and the Authority is now requested to base the international search, to the extent possible, on the results of that earlier search. Identify such search or request either by reference to the relevant application (or the translation thereof) or by reference to the search request:

Country (or regional Office):

Date (day/month/year):

Number:

Box No. VIII CHECK LIST

This international application contains the following number of sheets:

1. request : 4 sheets
 2. description : 20 sheets
 3. claims : 1 sheets
 4. abstract : 1 sheets
 5. drawings : 6 sheets

Total : 32 sheets

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

1. ☐ separate signed power of attorney
 2. ☐ copy of general power of attorney
 3. ☐ statement explaining lack of signature
 4. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
 5. ☒ fee calculation sheet
 6. ☐ separate indications concerning deposited microorganisms
 7. ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing (diskette)
 8. ☐ other (specify):

Figure No. _____ of the drawings (if any) should accompany the abstract when it is published.

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Hirose Takayoshi (SEAL)

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	<input type="checkbox"/> received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	<input type="checkbox"/> not received:
5. International Searching Authority specified by the applicant: <u>ISA /</u>	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:



(51) 国際特許分類6 A01K 67/027	A1	(11) 国際公開番号 WO99/03336 (43) 国際公開日 1999年1月28日(28.01.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02927 (22) 国際出願日 1998年6月30日(30.06.98) (30) 優先権データ 特願平9/205235 1997年7月14日(14.07.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本ハム株式会社 (NIPPON MEAT PACKERS, INC.)[JP/JP] 〒541-0054 大阪府大阪市中央区南本町3丁目6番14号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 村上 博(MURAKAMI, Hiroshi)[JP/JP] 藤村達也(FUJIMURA, Tatsuya)[JP/JP] 高萩陽一(TAKAHAGI, Yoichi)[JP/JP] 豊村浩司(TOYOMURA, Koji)[JP/JP] 重久 保(SHIGEHISA, Tamotsu)[JP/JP] 〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原3丁目3番 日本ハム株式会社 中央研究所内 Ibaraki, (JP)		(74) 代理人 弁理士 廣瀬孝美(HIROSE, Takayoshi) 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満5丁目13番3号 高橋ビル北3号館6階 Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開 ; 補正書受領の際には再公開される。
(54)Title: TRANSGENIC MAMMALS (54)発明の名称 トランスジェニック哺乳動物 (57) Abstract Transgenic non-human mammals which have a human complement regulator (DAF/CD55) gene and in which this regulator has been expressed in the organs and tissues, in particular, vascular endothelial cells. These transgenic mammals are useful as laboratory animals in the fields of medicine, pharmacy, etc. and/or sources for organs, tissues, cells, etc. to be used in treating humans.		

本発明は、ヒトの補体制御因子 (DAF/CD55) の遺伝子を有し、当該ヒトの補体制御因子を臓器・組織、特に血管内皮細胞に発現しているヒト以外のトランスジェニック哺乳動物である。本発明のヒト以外のトランスジェニック哺乳動物は、医学、薬学などの分野における実験動物として及び／又はヒトの治療目的に供する器官、組織、細胞などの供給源として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン						

明 細 書

トランスジェニック哺乳動物

5 技術分野

本発明はトランスジェニック哺乳動物に関する。より詳細には、ヒトの補体制御因子(hDAF/CD55)の遺伝子を有するヒト以外のトランスジェニック哺乳動物に関する。さらに詳細には、hDAFの遺伝子を有する家畜及び実験動物に関する。

10 背景技術

近年、動物臓器をヒトへの移植（異種移植）に供するための研究が欧米を中心に盛んになってきている。臓器を提供する動物としては、ヒトに最も近い点でサルが好ましいが、サルは希少で知性の高い野生動物であることから、サルの利用は困難な状況にある。そこで、家畜、中でも臓器サイズ、形態がヒトに近く、繁殖や増産技術の確立しているブタの臓器を利用するための研究が主に行われるようになってきた。

しかし、ブタの臓器をヒトに移植した場合には急激に（数分のうちに）強い拒絶反応（超急性拒絶）が起こり、移植した臓器は機能を失ってしまうことが知られている。

20 このような現象は一連の反応の結果として生じると考えられている。即ち、（1）ヒトの血液中にはもともとブタの細胞に対する抗体（自然抗体と呼ぶ）が存在するので、ヒトの体内にブタの組織が移植されると、自然抗体がブタの組織を認識し抗原抗体複合物が作られる。（2）抗原抗体複合物はヒトの血清中に含まれる補体を活性化して補体カスケード反応を惹起させる。即ち、その抗原抗体複合物に補体成分C
25 1が、続いてC4、C2が反応し、それらはC3転換酵素を形成する。C3転換酵素はC3を活性化し、C3bとC3aに分解する。C3bはブタ組織の細胞膜表面に結合するとともに、C5転換酵素を形成することでC5を活性化しC5bとC5aに分解する。C5bも膜に結合し、その後連続的にC6、C7、C8、C9と補体分子は反応して行く。（3）補体カスケード反応の結果として膜侵襲複合体（Membrane Attack Complex：MAC）が作られ（古典経路と
30 称する）、MACが移植されたブタの臓器を侵襲すると共に血栓も形成される。（4）

また、古典経路と共に代替経路と称する補体カスケード反応のあることも知られている。代替経路の場合でも、C3ステップ以降は上記と同様のカスケード反応が行われ、最終的にはMACが形成される。

5 Miyagawa, S. ら (Transplantation, Vol.46(6), 825-830, 1988) はつぎのことを報告した； (1) 異種移植された臓器や器官の超急性拒絶は古典経路及び／又は代替経路による補体カスケード反応の惹起により生じる； (2) CVF (cobra venom factor) の事前投与によりC3を欠損させておけば超急性拒絶を生じない。これらのことから、C3ステップで補体カスケード反応を阻止する膜結合型の因子であるDAF及び／又はMCP、特にレシピエント種と同種のDAF及び／又はMCPを発現する動物の作成が望まれていた。

10 そこで、ブタの臓器にヒトのC3転換酵素を分解する作用を有する補体制御因子であるhDAF (CD55) を発現させたトランスジェニックブタの開発が試みられている (A. M. Rosengardら、Transplantation, Vol.59(9), 1325-1333, 1995；G. Byrneら、Transplantation Proceedings, Vol.28(2), 759, 1996)。

15 しかし、これらのトランスジェニックブタが超急性拒絶反応を完全に抑制することができると否かは現在までのところ明らかになっていない。今後、1) 必要な組織に必要な量のhDAFが発現できているか、2) hDAF以外の別の補体制御因子の複合発現が必要でないか、さらには3) ブタ細胞上に発現されていてヒトの自然抗体が結合する抗原 (糖鎖抗原) を減少させる働きを有する糖転移酵素遺伝子の発現が必要ではないか、4) 上記の遺伝子群及びそれら以外の遺伝子、例えば血栓の形成を阻害する働きを有する蛋白質をコードする遺伝子を同時に発現させることが必要ではないか等を検討する必要がある。即ち、超急性拒絶抑制方法を開発のためには、解明すべき課題が多く残されている。

20 上述の不明な点を解決するためには、ブタ及び／又はブタより取り扱い易い小型の実験モデル動物を開発して、種々の検討をすることが急務である。とりわけ、目的とする臓器や組織に少なくともヒトと同レベル以上のhDAFを発現するトランスジェニックブタの開発及び／又はブタより取り扱い易い小型の実験モデル動物の開発は、この分野の研究の遂行上及び／又は臨床応用法の開発上、有用と考えられる。

25 そこで、上述のように、これまでもヒトの補体制御因子を発現するトランスジェニックブタの開発が試みられてきている。そして、その発現は、(1)免疫組織学的方法

法等のin vitro試験、(2)トランスジェニックブタの組織をヒト血液と接触させるex vivo試験、又は(3)トランスジェニックブタの組織を霊長類に移植するin vivo試験などにより確認されている。トランスジェニックブタの組織をex vivo試験やin vivo試験に供した場合には、非トランスジェニックブタの組織を試験に供した場合に比べて、機能保持時間を延長できることが確認されている。

但し、これらのトランスジェニックブタの組織に発現されているヒト補体制御因子の量がヒトの組織に発現されている量に比べて同程度かそれ以上であるかについては必ずしも明確にされていない。

また、これまでに報告されているヒト補体制御因子遺伝子を発現するトランスジェニックブタを作成するのに用いられた導入遺伝子コンストラクトのプロモーター遺伝子は、(1)ブタを起源とするものではなく(G.A.Langfordら、Transplant. Proc., 26, 1400, 1994; W.L.Fodorら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 11153-11157, 1994; G.W.Byrneら、Transplantation 63, 149-155, 1997)及び/又は(2)動物の体内の全組織的に分布している分子に関連するプロモーター(例えば、 β -アクチン、H2K^b)であった。

一方、これまでもhDAFを発現するトランスジェニックマウスの開発が試みられてきている(N.Caryら、Transplantation Proceedings, Vol.25(1), 400-401, 1993; D.Kaganら、Transplantation Proceedings, Vol.26(3), 1242, 1994)。しかし、開発されたトランスジェニックマウスのhDAFの発現部位、発現量は、報告例ごとに異なり、厳密に言えば、ヒトの補体制御因子を本来、発現しておくべき部位(特に、血管内皮細胞)にヒトで発現している量を上回るレベルで発現させたトランスジェニックマウスは開発されていなかった。

上記課題を解決するために、本発明者らは補体制御因子が本来発現されるべき器官、臓器、組織や細胞、特に血管内皮細胞にhDAFを発現したトランスジェニック動物、特にヒト以外の哺乳動物の作製を検討した。その結果、本発明者らが先に発明したブタ補体制御因子(pMCP)プロモーター(日本国特願平9-142961号参照)を用い、補体制御因子が本来発現されるべき器官、臓器、組織や細胞、特に血管内皮細胞にhDAFを発現するように考案した遺伝子を動物の受精卵に導入し、レシピエント母親動物の子宮に移植し、出産させることにより所期の目的を達成するトランスジェニック動物を作製できることが判明した。

また、後記の実施例でも示されるように、本発明のトランスジェニックマウスの場合には、hDAFが各種の臓器、組織、その血管内皮細胞と共に、赤血球並びに中枢及び末梢神経にも発現されており、発現量はヒトの細胞の発現量以上であった。更に、本発明のトランスジェニックブタの場合にも、赤血球や神経にもhDAFが発現していることが確認された。

本発明に係る知見に基づいてなされたもので、本発明は医学や薬学の分野で有用なトランスジェニック動物を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明は、ヒトの補体制御因子(DAF/CD55)の遺伝子を有し、当該ヒトの補体制御因子を臓器・組織に発現しているヒト以外のトランスジェニック哺乳動物に関する。更に、本発明は、ヒトの補体制御因子(DAF/CD55)を血管内皮細胞、特に全臓器・組織の血管内皮細胞に発現しているトランスジェニック哺乳動物に関する。

また、本発明のトランスジェニック哺乳動物は、ヒトの補体制御因子(DAF/CD55)の遺伝子上流側にブタ補体制御因子(pMCP)プロモーターを有することが好ましい。

本発明に係るトランスジェニック哺乳動物は、家畜又は実験動物として有用である。

図面の簡単な説明

図1は、pMCPプロモーター(5.4kb)とhDAFcDNAを含む導入用遺伝子の構造を示す図である。

図2は、pMCPプロモーター(0.9kb)とhDAFcDNAを含む導入用遺伝子の構造を示す図である。

図3は、比較として用いたhDAFプロモーターとhDAFcDNAを含む導入用遺伝子の構造を示す図である。

図4は、トランスジェニック哺乳動物及び非トランスジェニックである哺乳動物について、hDAFcDNA特異的プライマーを用いてPCR反応を行った結果を示す図である。なお、図中の(1)と(3)はそれぞれhDAFcDNAを有することが確認されたブタとマウスの結果であり、(2)と(4)はそれぞれ同腹産仔のうちhDAFcDNAを有さないことが確認されたブタとマウスの結果である。

図5は、TgF1マウス、比較のトランスジェニックマウス及び通常のマウス（非トランスジェニックマウス）の各種臓器中のhDAF由来のmRNAの発現を示す図である。なお、（A）はTgF1マウスの各種臓器に発現されたmRNAを示す図であり；（B）は比較のトランスジェニックマウス（hDAFプロモーターとhDAFcDNAを含む導入用遺伝子（3）（図3参照）を導入して得たトランスジェニックマウス）の各種臓器に発現されたmRNAを示す図であり；（C）は非トランスジェニックマウスの各種臓器に発現されたmRNAを示す図であり、最右端はヒトリンパ球細胞（k562）におけるhDAF由来mRNAの発現を示す。また、図中の記号のB、H、K、Li、Lu、S及びTは、それぞれ脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び精巣を意味する。

図6は、トランスジェニックブタ及び同腹産仔の内、非トランスジェニックであったブタより採取した赤血球について抗hDAFモノクローナル抗体を用いてFACS解析を行った示す図である。なお、（A）はトランスジェニックブタより採取した赤血球のhDAFの発現頻度を示す図であり；（B）は比較のために、同腹産仔の内、非トランスジェニックであったブタより採取した赤血球にはhDAFが発現されていないこと示す図である。

図7は、トランスジェニック動物（●印）及び通常動物（■印）より採取した赤血球とヒト血清を反応させた際の溶血の程度を示す図である。なお、（a）はマウス赤血球、（b）はブタ赤血球について調べた結果を示す図である。図の横軸は補体含有量調整ヒト血清中のHNSの割合を示し、縦軸は溶血率を示す。

発明を実施するための最良の形態

前述のように、本発明は、ヒト以外のトランスジェニック哺乳動物であって、ヒトの補体制御因子（以下、hDAFという）の遺伝子を有し、当該ヒトの補体制御因子を臓器・組織に発現していることからなり、特に血管内皮細胞に発現していることからなる。本発明における哺乳動物はヒト以外の哺乳動物であれば特に限定されず、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ウサギ、イヌ、ネコなどが例示される。

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、以下の方法により作製することができる。

まず、プロモーターとhDAFcDNAを結合した導入用遺伝子を調製する。この方法と

しては、適当なベクター(例えば、pGL-3ベーシックベクター、pBluescript等)の一部を制限酵素で抜き取り、そのベクター側の末端を常法に準じて平滑化しておく。

一方、hDAFcDNA(例えば、Medof, M. E.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84, 2007, 1987等参照)より、hDAF をコードする塩基配列の開始コドンの直前から終始
5 コドン直後の領域を制限酵素で切り取り、その末端を常法に準じて平滑化した後、
上記のベクターの平滑化した部分に挿入し、更に適当なプロモーターをhDAFcDNA挿
入部位の上流側に挿入する。

上記のプロモーターとしては、hDAFを哺乳動物の体内で発現し得るプロモーター
であれば特に限定されず、例えば、エンドセリンのプロモーターなどが例示できる
10 が、本発明者らはブタ補体制御因子(pMCP)プロモーターが特に好適であることを
見い出している。なお、ブタ補体制御因子(pMCP)プロモーターの塩基配列を配列
番号1として示す(日本国特願平9-142961号参照)。

かくして得られたベクター(環状遺伝子)より、プロモーターとhDAFを含む領域
を適当な制限酵素で切り出すことにより、導入用遺伝子が調製される。

15 なお、上記の工程における個々の手法は当業者に知られており、各工程は常法に
準じて行うことができる。

トランスジェニック哺乳動物は、上記で調製された導入用遺伝子を哺乳動物の受
精卵(前核期卵)の前核にマイクロインジェクション法などの慣用の方法で導入し、
当該受精卵を必要に応じて培養し、又は培養せず直に疑妊娠状態に同期化させてお
いた雌性哺乳動物(レシピエント哺乳動物)の卵管又は子宮に移植し、産仔を得る
20 ことにより作製される。なお、前核にマイクロインジェクションを行う際に、受精
卵内の多量の脂肪粒の存在等により前核の確認が困難な場合には、常法に従って予
め遠心処理を行う。

作製された産仔がトランスジェニック哺乳動物であることの確認は、後記のドッ
25 トブロットング法、PCR法、免疫組織学的方法、補体抵抗性試験などにより行うこと
ができる。

かくして得られたトランスジェニック哺乳動物は、常法に準じて交配し、産仔を
得ることにより繁殖させることができる。また、当該トランスジェニック哺乳動物
の細胞を初期化培養し、又はせずに、その細胞から核を採取し、予め除核しておい
30 た受精卵に移植(核移植)し、レシピエント哺乳動物の卵管又は子宮に移植し、ク

ローン産仔を得ることによっても繁殖させることもできる。

後記の実施例に示されるように、本発明で得られたトランスジェニック哺乳動物はhDAF遺伝子を有し、また全臓器の血管内皮細胞にhDAFを発現しており、ヒト補体に対する抵抗性を有することが確認された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、下記のような効果が得られ、医学、薬学などの分野で有用である。

(1) 本発明のトランスジェニック哺乳動物の臓器、例えば心臓、肺、肝臓、腎臓などとヒトの血液を接触させるか、又はこれらの臓器を霊長類の動物に移植すれば、hDAFが異種移植に伴う超急性拒絶の回避に有用であることを確認することができる。

(2) 本発明のトランスジェニック哺乳動物の臓器、例えば心臓、肺、肝臓、腎臓などとヒトの血液を接触させるか、又はこれらの臓器を霊長類の動物に移植して異種移植モデルを作製すれば、異種移植時の超急性拒絶の回避を補完する薬剤・処置器材等及び／又は超急性拒絶の後に発生すると危惧されている急性又は慢性拒絶を回避するための薬剤・処置器材等の開発に資することができる。

(3) 補体制御因子の発現だけでは解決できない超急性拒絶に関する問題点を顕在化させるための研究開発を行うことが可能となる。即ち、超急性拒絶の回避のためには、補体制御因子の導入と共に、ヒトの自然抗体が結合するブタ細胞上の糖鎖抗原の発現を減少させる機能を有する糖転移酵素の導入及び／又は血管内皮の恒常性を維持する因子（例えば、トロンボモジュリンなど）の導入が必要か否かの議論に解答を与えることができる。

(4) 本発明のトランスジェニック哺乳動物に他の補体制御因子（ヒトMCPとヒトCD59）を発現するトランスジェニック哺乳動物を交配させるなどすれば、それぞれの補体制御因子の相乗効果を検討することも可能である。

(5) 本発明のトランスジェニック哺乳動物の臓器（例えば、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓等）、臓器に付属する組織（例えば、冠状動脈、脳硬膜等）や細胞（例えば、インスリンを産生するランゲルハンス島、ドーパミンを産生する脳黒質線条体細胞等）等をヒト患者に移植すれば既にダメージを受け機能を失調させた患者臓器等の補完、あるいはその代用とすることができる。

(6) 本発明のトランスジェニック哺乳動物の臓器の細胞（例えば、肝臓、腎臓などの臓器から採取した細胞、インスリンを産生するランゲルハンス島、ドーパミンを産生する脳黒質線条体細胞）を培養し、培養細胞を適宜器材装置等に組み入れ、対応する臓器の機能が失調しているヒト患者と体外循環系を介して接続すれば、失調している臓器の代替や治療として活用することが可能となる。

実施例

以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例

①導入用遺伝子の構築

pMCPプロモーターとhDAFcDNAを連結した導入用遺伝子を下記の要領で作製した。

即ち、pGL-3ベシックベクター(Promega)より、luc. 遺伝子をNcoIサイトとXbaIサイトで抜き取り、ベクター側の両末端をT4 DNA polymeraseで平滑化した。次に、第一イントロンを含むhDAFcDNAを、ATG開始コドンの直前のAscIサイトとTAG終始コドンの直後のAccIコドンで切り出し、T4 DNA polymeraseで平滑化し、前述のベクターの末端平滑化した部分に挿入した。また、ブタゲノムファージライブラリーのpMCP遺伝子（特願平9-142961号）を含む領域より、プロモーターに相当する部分の約5.4kbをEcoRIとFspIサイトで切り出し、pBluescriptベクターのEcoRIとEcoRVサイトに挿入した。

(1) pBluescriptベクターに挿入したプロモーター部分の約5.4kbをBstEIIとEcoRIで切り出し（配列番号1の塩基配列2～5392番の配列を有する断片）、T4 DNA polymeraseで平滑化し（配列番号1の塩基配列2～5397番の配列を有する断片）、前述のベクターのhDAFcDNA挿入部位のすぐ上流にあるSmaIサイトに挿入した。そして、上記のプロモーターとhDAFcDNAを含む領域をNotIとEco47IIIサイトで切り出し、導入用遺伝子（1）とした（図1参照）。

(2) プロモーターを挿入したpBluescriptベクターより、pMCPのATG開始コドンの直前にあるBstEIIサイトとBssH2で1.7kbのプロモーター領域を切り出し、末端をT4 DNA polymeraseで平滑化した後、前述のhDAFcDNAを含むベクターのSmaIサイトに挿入した。さらに、プロモーター部分よりさらに上流にあるpBluescript由来のBstXI

5 サイトとSpeIサイトで切断しプラスミドを直鎖状にし、Kilo-Sequence用Deletion Kit (Takara社製) を用いてプロモーター領域が0.9Kbの長さ (配列番号1の塩基配列4498~5397番の配列を有する) になるまで短縮したdeletion mutantを得た。そして、上記のプロモーターとhDAFcDNAを含む領域をNotIとEco47IIIサイトで切り出し、導
5 入用遺伝子 (2) とした (図2参照)。

(3) 一方、hDAFプロモーターとhDAFcDNAを連結した導入用遺伝子 (3) を下記の要領で作成した。即ち、hDAFプロモーターは、プロモーターに相当する部分の約3.8kbの領域をHindIIIサイトとAscIサイトで切り出し、末端を平滑化し、前述のベクターのhDAFcDNA挿入部位のすぐ上流にあるSmaIサイトに挿入した。そして、上記のプロ
10 モーターとhDAFcDNAを含む領域をNotIとEco47IIIサイトで切り出し、導入用遺伝子 (3) とした (図3参照)。

それぞれの導入用遺伝子は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて5 μ g/mlの濃度に調整して用いた。

15 ②トランスジェニック哺乳動物 (マウス) の作成

マイクロインジェクション法による導入用遺伝子のマウス受精卵への導入とトランスジェニックマウスの作成を下記の要領で行った。

即ち、CBAマウスあるいはC3HマウスのオスにC57BL/6マウスのメスを交配させ、産子を得た。このメスを採卵用マウス (ドナー) に供した。ドナーマウスに過排卵処理 (PMSGとhCGの投与) した後、ICRマウスのオスと交配させ、受精卵 (前核期卵) を採取した。この前核期卵に、前述の導入用遺伝子 (1) 又は (3) をマイクロイン
20 ジェクション法により、前核が膨らむのがわかる程度まで注入した。そして、導入用遺伝子の注入された前核期卵を直ちにレシピエントマウスの卵管に移植し、あるいは導入用遺伝子の注入された前核期卵を3日間培養した後にレシピエントマウスの子宮に移植した。そして、産子を得た。なお、レシピエントマウスは精管結紮
25 マウスと予め交尾させて疑妊娠状態にしておいた。

③トランスジェニック哺乳動物 (ブタ) の作成

マイクロインジェクション法による導入用遺伝子のブタ受精卵への導入とトランスジェニックブタの作成を下記の要領で行った。

30

即ち、ランドレース種、大ヨークシャー種及びデロック種の交雑種の雌豚を採卵用豚（ドナー豚）に供した。ドナー豚に過排卵処理（PMSGあるいはFSHとhCGの投与）した後、デロック雄豚の精子を用いて人工授精法により受精させ、受精卵（前核期卵）を採取した。この前核期卵を遠心分離機で処理し（12,000 x g, 8分間）、その後、前記導入用遺伝子（2）をマイクロインジェクション法により、前核が膨らむのがわかる程度まで注入した。そして、導入用遺伝子の注入された前核期卵を直ちにレシピエント豚の卵管に移植した。そして、産子を得た。なお、レシピエント豚には、予め前述の過排卵処理を行いドナー豚と性周期を同期化しておいた豚、あるいは受精卵を採取した後のドナー豚を供した。

④トランスジェニック哺乳動物の同定

レシピエント哺乳動物から得られた産仔の尾部から常法によりゲノムDNAを抽出し、下記の2方法によりトランスジェニック哺乳動物の同定と選抜を行った。

(1) ドットブロットティング法：供試産仔のゲノムDNA(10 μ g)をメンブレンに固定し、予めビオチンラベルしておいたhDAFcDNAの一部からなる遺伝子とハイブリダイゼンさせた。アルカリホスファターゼを用いた発色反応（スマライト、住友金属社製）を行い、導入遺伝子の組込みの有無を検出し、トランスジェニック哺乳動物を同定した。

(2) PCR法：供試産仔のゲノムDNAをテンプレートとして、hDAFcDNA由来の5'-GGCCTTCCCCCAGATGTACCTAATGCC-3'をセンスプライマー、同5'-TCCATAATGGTCACGTTCCCCTTG-3'をアンチセンスプライマーとするPCR反応を行った（条件；94℃ 30秒間、68℃ 2分30秒間、30回）。そして、導入遺伝子の組込みの有無を検出し、トランスジェニック哺乳動物の同定を行った。その結果を図4に示す。図4に示すように、レシピエント哺乳動物から得られた産仔の内には、そのゲノム中にhDAFcDNAを有するマウス及びブタの存在することが確認された。なお、図4中の1と3はそれぞれhDAFcDNAを有することが確認されたブタとマウスの結果であり、図4中の2と4はそれぞれ同腹産仔のうちhDAFcDNAを有さないことが確認されたブタとマウスの結果である。

⑤トランスジェニック哺乳動物（マウス）の繁殖

トランスジェニックと同定されたマウスを、ICRマウスと交配させ、導入遺伝子を持つ産子 (TgF1マウスという) を作出した。

⑥トランスジェニック哺乳動物 (マウス) における導入遺伝子の発現の確認 (mRNAの発現)

TgF1マウスの各種臓器からmRNAを抽出し、常法のRT-PCR法を用いて、臓器中のhDAF由来のmRNAの発現を調べた。なお、比較例として、hDAFプロモーターとhDAFcDNAを含む導入用遺伝子 (3) を導入して得たトランスジェニックマウス及び通常のマウス (非トランスジェニックマウス) についても、各種臓器からmRNAを抽出し、上記と同様な方法でhDAF由来のmRNAの発現を調べた。その結果を図5に示す。なお、図中の記号、B、H、K、Li、Lu、S及びTは、それぞれ脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び精巣を意味する。

その結果、pMCPプロモーターとhDAFcDNAを含む導入用遺伝子 (1) (図1参照) を導入して得たトランスジェニックマウスの場合には、検討した臓器 (脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び精巣) の全てにhDAFcDNAに由来するmRNAの発現を示す強いシグナルが認められた (図5のA)。このことから、TgF1マウスは全臓器でhDAF由来のmRNAを発現していることが明かとなった。

一方、hDAFプロモーターとhDAFcDNAを含む導入用遺伝子 (3) (図3参照) を導入して得たトランスジェニックマウスの場合には、精巣のみにhDAFcDNAに由来するmRNAのシグナルが認められたが、その他の臓器では、シグナルは認められないか、認められても非常に弱いものであった (図5のB)。

なお、非トランスジェニックマウスの場合には、いずれの臓器においても、hDAFに由来するmRNAの発現は認められなかった (図5のC)。

また、ヒトリンパ球細胞株 (K562) について同様の分析をした場合には、hDAFに由来するmRNAの発現が認められた (図5のCの最右端)。

⑦トランスジェニック哺乳動物 (マウス) における導入遺伝子の発現の確認 (免疫組織学的手法によるhDAF蛋白質の発現の確認)

TgF1マウスの各臓器の凍結切片を作成し、ビオチン化抗hDAFモノクローナル抗体を反応させた。その後に、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを結合させた。

これに発色基質（ジアミノベンジジン；DAB）を作用させ、顕微鏡観察によりhDAF蛋白質の発現強度及び発現部位を検討した。その結果を下記表1に示す。

表1に示されるように、pMCPプロモーターとhDAFcDNAを含む導入用遺伝子（1）を導入して得たトランスジェニックマウスの場合には、観察した全臓器にhDAFの強い発現が認められた。発現の確認された臓器は心臓の心房筋、心室筋と中小・毛細血管内皮、腎臓の糸球体、尿細管と中小・毛細血管内皮、肝臓の肝細胞、胆管上皮と中小・毛細血管内皮、肺の肺胞、気管上皮と中小・毛細血管内皮、腸の腸粘膜上皮と中小・毛細血管内皮、膵臓の外分泌腺細胞、ランゲルハンス島、膵管上皮と中小・毛細血管内皮、脾臓の白脾臓、赤脾臓、脾柱と中小・毛細血管内皮、脳の大脳皮質と髄質、小脳皮質と髄質と中小・毛細血管内皮、精巢の精上皮細胞、間細胞、精子と中小・毛細血管内皮、及び抹消神経であり、全臓器にわたっていた。

一方、hDAFプロモーターとhDAFcDNAを含む導入用遺伝子（3）を導入して得たトランスジェニックマウスの場合には、精巢のみにhDAFの発現が認められた。しかし、精巢の血管内皮細胞には発現が認められなかった。

表 1

臓 器		プ ロ モ ー タ ー		通常マウス
		p M C P	h D A F	
心臓	心房筋	++	-	-
	心室筋	+	-	-
	中小・毛細血管内皮	++	-	-
腎臓	糸球体	++	-	-
	尿細管	-	-	-
	中小・毛細血管内皮	++	-	-
肝臓	肝細胞	±	-	-
	胆管上皮	++	-	-
	中小・毛細血管内皮	++	-	-
肺	肺胞	++	-	-
	気管上皮	++	-	-
	中小・毛細血管内皮	++	-	-
腸	腸粘膜上皮	+	-	-
	中小・毛細血管内皮	++	-	-
膵臓	外分泌腺細胞	+	-	-
	ランゲルハンス島	+	-	-
	膵管上皮	+	-	-
	中小・毛細血管内皮	++	-	-
脾臓	白脾臓	±	-	-
	赤脾臓	±	-	-
	脾柱	+	-	-
	中小・毛細血管内皮	++	-	-
脳	大脳皮質	++	-	-
	髄質	++	-	-
	小脳皮質	+	-	-
	髄質	++	-	-
	中小・毛細血管内皮	++	-	-
精巣	精上皮細胞	++	±	-
	間細胞	+	±	-
	精子	++	++	-
	中小・毛細血管内皮	++	-	-
末梢神経		+++	-	-

⑧トランスジェニック哺乳動物（ブタ）における導入遺伝子発現の確認（免疫組織学的手法によるhDAF蛋白質の発現の確認）

④に記載のPCR法によりトランスジェニックであることが確認されたブタについてhDAF蛋白質の発現を確認した。

5 即ち、⑦と同様に、当該ブタの尾部の凍結切片を作成し、ビオチン化抗hDAFモノクローナル抗体を反応させた。その後に、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを結合させた。これに発色基質（ジアミノベンジジン；DAB）を作用させ、顕微鏡観察によりhDAF蛋白質の発現強度及び発現部位を検討した。

10 その結果、pMCPプロモーターとhDAFcDNAを含む導入用遺伝子（2）を導入して得たトランスジェニックブタの組織切片の中小・毛細血管内皮にhDAFの発現が認められた。その他にも抹消神経、骨格筋、皮膚重層扁平上皮などの組織でhDAFの発現が認められた。

⑨トランスジェニック哺乳動物（ブタ）における導入遺伝子発現の確認（FACS解析によるhDAF蛋白質の発現と発現強度の確認）

15 ④に記載のPCR法及び⑧に記載の免疫組織学的手法によりトランスジェニックであることが確認されたブタの組織を抗hDAFモノクローナル抗体を用いるFACS(Fluorescence-activated cell sorter, ベクトンディキンソン社製FACScan) 解析に供し、hDAF蛋白質の発現を確認した。

20 即ち、当該ブタから血液を採取し、赤血球画分を得た。この赤血球にビオチン化抗hDAFモノクローナル抗体を反応させた。その後に、Phycoprobe PE Streptavidin (Biomedica社製) を結合させ、FACScanにより発現強度を検討した。その結果を図6 (A) に示す。また、同腹産仔の内、非トランスジェニックであったブタについて同様のFACS解析を行った結果を図6 (B) に示す。なお、図6の横軸は各細胞当たりの蛍光強度、即ちhDAFの発現強度を表わし、縦軸は各強度当たりの細胞数を表わす。

25 図6が示すように、PCR法及び免疫組織学的手法によりトランスジェニックであることが確認されたブタから採取した赤血球は、hDAFを発現しており、その発現量も多いことが認められた。一方、非トランスジェニックブタの場合には、hDAFを発現していなかった。

図6に示すように、本例で得られたトランスジェニックブタの場合には、赤血球全体のポピュレーションの中にhDAFを発現する赤血球とhDAFを発現しない赤血球が混在する(モザイクと称する)。なお、マイクロインジェクション法により作成されたトランスジェニック動物の第一世代目(Founder)個体がモザイクを呈すること、及び交配や育種等の慣用の手段によりモザイクが解消されることは既に知られている。

⑧と⑨に示す結果から、pMCPプロモーターとhDAFcDNAを含む導入用遺伝子を導入して得たトランスジェニックブタは、hDAFcDNAに由来するhDAF蛋白質を血管内皮細胞を含む広範囲の臓器組織に発現していることが分かった。

⑩トランスジェニック哺乳動物における導入遺伝子の発現の確認 (hDAF蛋白質の機能の確認)

トランスジェニック哺乳動物の細胞上に発現されたhDAF蛋白質がhDAF蛋白質本来の機能、すなわち補体カスケード反応の抑制作用を有すること確認した。この確認はトランスジェニック哺乳動物の赤血球にヒト血清を反応させ、溶血の有無を測定することにより行った。なお、トランスジェニック哺乳動物の細胞として赤血球を用いたのは、(1)補体カスケード反応による膜侵襲複合体形成の有無を溶血の有無により簡便に検定可能であること、(2)赤血球の膜は他の細胞(例えば、白血球、血管内皮細胞など)の膜より脆弱であるので、補体カスケード反応の強弱をより鋭敏に検定可能であることに依る。

トランスジェニックマウス及び非トランスジェニックマウスの尾部、並びにトランスジェニックブタ及び非トランスジェニックブタの耳静脈より血液を採取し、赤血球画分を得た。それぞれの赤血球をPBSにて希釈後、96穴マイクロプレートの各ウェルに30 μ lずつ分注し(1x10⁷個/ウェル)、その後、補体含有量調整ヒト血清(無処理の正常ヒト血清[HNS]と予め非働化处理[56℃30分間の加熱]しておいたヒト血清[HIS]を種々の割合で混合し、ヒト補体の含有量を調整しておいた血清)70 μ lを上記のウェルに滴下し、赤血球と反応させた(37℃、1.5時間)。その後、各ウェル上清液の405nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio-Rad社製)を用いて測定し、補体反応により生じる溶血の割合を算出した。

その結果を図7に示す。但し、図7(a)はトランスジェニックマウスの結果、図7(b)はトランスジェニックブタの結果である。また、図7の横軸は補体含有量調整ヒ

ト血清中のHNSの割合、即ちヒト補体の濃度を示し、縦軸は各赤血球の溶血率を示す。なお、図中、○印はトランスジェニック動物より、■印は通常の動物より採取した赤血球である。

5 なお、このような溶血反応は、(1) ヒト血清中には自然抗体と補体が含まれているので、動物の赤血球と共存すると補体の古典経路反応が速やかに活性化されることが、(2) 補体制御因子の種特異性は高く、動物（本発明のトランスジェニック動物は除く）の赤血球はヒトの補体反応を制御できないこと、によって生じる。

10 図7が示すように、非トランスジェニック動物の赤血球はヒト補体含有量の如何を問わず溶血した。一方、トランスジェニック哺乳動物の赤血球の溶血は抑制された。これらのことから、hDAF蛋白質を発現しているトランスジェニック哺乳動物の赤血球はヒト補体に対する抵抗性を有していることが確認された。なお、本実施例のトランスジェニックブタ赤血球のポピュレーションはモザイク状であったが、ヒト補体に対する抵抗性を有していた。

15

20

25

30

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 5, 4 1 8

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

直接の起源 : λ FIXII ブタゲノムファージライブラリー

配列

10	GAATTCTGCG TACACGGGGC CCCGGTGGCT TTACATCATC GCTACAGCGA	50
	CATGGGATCC GAGCCGTGTC TACAACCTAC ACAACAACGC CAGATCCTTA	100
	ACCCAATGCA TGAGGACAGG GCTCAAACCT GCGGCCCTCAT AGATGCTAGT	150
	CAGATTCGTT TCTGCTGAGC CACAATGGGA ACTCCTAATT CTAGATCGAT	200
	CTAGAATTAG GAGTTCCCAT TGTGGCTCAG CAGAAACGAA TCTGACTAGC	250
15	ATCTATGAGG CCGCAGTTTG AGCCCTGTCC TCATGCATTG GGTAAAGGAT	300
	CTGGCGTTGT TGTGTAGGTT GTAGACACGG CTCGGATCCC ATGTCGCTGT	350
	AGCGATGATG TAAAGCCACC GGGGCCCCGT GCTACGCAGA ATCNTGCAG	400
	CCCGGGGGAT CCACTAGTTC TAGCNAGAGA GTTGAAAATT TAAAGAACAT	450
	TTCTCCCCTA ATCTCCCAA ATATGGGCAA AGGACAGGTA CCCGTGGCAC	500
20	TGGA AAAATA CAGGCAAGCA ACCCATGAGT ACATGAAAAG ATGCTCCAGG	550
	GTTCGGCCTA ATGGAAGCCT GAACAATGCC TATCACATCG TGGGTTTCTG	600
	AAGAAGTAAC TTAAAGAAAC TAGAAATTAA ATGGCTTTCT TAGAATGAAA	650
	ATTCTCTATC ACAAGGAAAA ATGTTGTATG TTGTTTTTCC CATAATGGAG	700
	GTCAGTGGGC GCTATGATTA ACAAATATCT GATGCCTGTG ACTTTTAAAT	750
25	TGCAAGAAAT CTGTGNAGTT TTTTATTAT CTATGGGAAA TATTGCATAT	800
	ATTAATGATA TCACCTAACT TGTATTATTG AGCAATTCTG TCCACATCTG	850
	GCCTTTCATC TTTCATCTAA AAAGCAGGGG CTGGACCAAC TGACCTTCAG	900
	TGCCATTCTT ACTGCTAACA TTCTAATTTT GTTTTTATTG CCTTTTGTA	950
	CAAAAGTGTG AGAGAAGTCA TTTTAAGTCT GTGACATTAA ATGTAATTTT	1000
30	CTGTCTCCAG CATTATAATA AGAATCAAAG ATTTAATCTA ATACACCGAT	1050

	GGAATATTGT TTATAACGTA TTTACTGTTT CAAGCCTTCA AAACCAAGAG	1100
	AAAACAAAAT GAGTACCTGT TCCTTCTGAG AAATGCCCTT CTTCTGTTC	1150
	AGAATCCCTG TGTATAACAG GAATGCTCTC GAGTTAACAG CCAAGTAAGA	1200
	GGCCCATCGG CTGGCAGGTG CCCACCTAGC TAGGTGCAAG CAGAGGTGGC	1250
5	AGTGCTCCCA GGACCAACAG CAGAAACATG GCTTAACTAT CCTGTGTTTA	1300
	GCAGTTCTCT TACGGGTTTT CACAACACCT AAAAAGCGCC CTGATGGGGT	1350
	AAAGCCTCTG CCTTCATGCT GCTGCCCCGT CTCTGAAAAG CAGGACGTAA	1400
	ATATACAATT TAGGAGGTAA GAGGGACATC TGCCATTGTT TTCTTTAACA	1450
	CAGTCAGCCT CTGTTTAATG AATCCCAGCC ACCTCCCTCC ACCTACCATC	1500
10	ATTCTAAGG TTTGCAGAGG AGCTGCCATA GAGCTCAAAA CACGGWNTAC	1550
	AGACAAGCAT NTTCTCCATC CCTCCTCATC TTCTCACAGG CCGCTTGACA	1600
	ACATCTCTAG GAGGGGGTGG AGGCGCCACC AGTGTTTGAG CCCCTCGTTC	1650
	ACGCAAAGCC TTGACTCTGG AGTTCTAGTC CTCGCGGGAC CTTAGGAAGT	1700
	TCACGGTCAA TACTCCGCCC TTGGGCTCAG AACTAAGAG GATCTCCGGG	1750
15	TAAAGAGATA GACAGTAGCT CCATGCCTGA TTTAGGAAAA CTGTCCGTAC	1800
	AGACAGTTGT AATTCATTCC TTTCAGAGAC AAATCCTGCT CTCTTCCTAG	1850
	TTCCTGAAGT CATTAATAATC AAAAGCTCTC AGAAACGTCC CAGCATTTCG	1900
	TAAGTCCACG CTGGGGGAGG ATGGGCAGAG CCGTGTTTACG CGCGTTTGAC	1950
	AGCAACACCC ACTTATTTCA TTYAGTATCC ATAGGCATAT ATCATGCACC	2000
20	TGGTATAGGC CTCTCTCTCA GCACTGGAGA TACAGCAAGA AAACGCTATT	2050
	CCTGCCCCAT GGAGCTTGTW MARAAAAATA GANNNAAAAA CCCTTTANAA	2100
	ANGGAAGCTR CCNGMTGGGN CMAAGTNAAA ATTAAGTAAA AAGAAWCCG	2150
	TGARAAACC CTTCACTNAT ATTAAGAAAG AAANTAGCTT GATGAAACCC	2200
	CAGGTGTANA AATTNNCACT AAAACAATGS TCCCAATTAA AACCCCMMAA	2250
25	TTCATGGAAT TTACTIONAGT ANCCTGNAAC TAGGAAACC AAATTCTAGC	2300
	CNATAGTTTC TCCCTTCTAA ATNTTCTCAT GAGAAAACAA YTTATTTCCA	2350
	AAGANATTTT CCATGATGGG GAAAGTTTTT TTCAACTTTG CTCAGGTATA	2400
	AACTGAANAT ACAGCATTAAGTAA AGTAAAGATA GTTGACAGAGA CCACCAAATA	2450
	GATACCCGTT TTCANAAAAA GTGCCAACAT GGAGCCAGAG AACATTTCCG	2500
30	TTACATCACC CTTTTACGGC TTTGAAAATT AACAGAGATG ATAATCCCCC	2550

	MCCTTGGGTT	TCCNACTCCN	TCCCTCCTNA	ATTTTACCTC	CTTTAATTGT	2600
	CATCATGTCT	GGAGATTATA	ATCCAAGATA	CTAAGATGTT	TATNTCATAC	2650
	ATCGCCTCCA	CACAGTGTGT	CTNANAAGCT	CTTGCAAGAA	TCCAAACATT	2700
	GTGCTGGTCT	GGGTAGAAAA	GGAAATTCCA	TGGTTTGTG	AACCCAGGAA	2750
5	CTCTTCAGTA	CATCTCCGAG	GTAAAACTGT	TTAAATACAA	TTAAAGTTCT	2800
	ACAGTTAAAG	GGTACCCTCC	TCCACTGTTG	GTGGGAATGT	AAACTGGTAC	2850
	AATCACTATG	AAAAACAGGA	TGGAGGTACT	TCAGAAAATG	AAGTATAGAA	2900
	CTACCACAGG	ATCCAGCACT	CTCACTCCTG	GGCACCTATC	AGGACAAAAA	2950
	ATTCGCTGCA	AAAGATGCAT	GCACCCATAG	CTATGTTTAC	TGCAGCAGCA	3000
10	TTCACAATAG	CCAAGACATG	GAAACGACCT	AAATGTCCAT	CAACAGCTGA	3050
	ATGCATTAAG	AAGACGTGGT	ATATACACAC	AATGGAATAC	TACTCAAGTC	3100
	ATGAAAAAGA	ACAAAAGAAT	GCCATTTGCA	GCAACATGGC	ATGGCTGGAA	3150
	CTAGAGACTC	ATGCTAAATG	AAGTCAGTGA	GAAAGAGAAA	GACAAATACC	3200
	ACATGATATC	ACTTATATCT	GGAATCTAAT	ATACGACACA	CATGAAACTT	3250
15	TCCACAGAAA	AGAAAACCTN	CATGGACTTT	GGAGAACAGA	CTTGTGGTTT	3300
	CSCCAAGGGG	GGARGGGGGG	AAGACCGTGG	GAGGACTGGG	GAGCTTTGGG	3350
	GTTAATAGAT	GCAAAACTAT	TGCCTTTNGA	ATGGATAAGC	CAATGGGATC	3400
	CTGCTGTACC	AGAACCRGGG	AACTATANCT	AGTCACTTGC	KNTAGAACAT	3450
	GATGGAGGAT	NATNTGAGAN	AAAGAATATN	TGTGTGTGK	AGAGAGAGAG	3500
20	AGACTGGCTC	CACTTTGCTG	TATAGTAGAA	AACTGACAGA	ACACCGTAAA	3550
	CCATTAAATA	AAAATCCAGT	AAAAATTTAA	AAATAAAAAC	ACACATTGGT	3600
	TCCAATGTGT	TTAAAAGCAA	TAAAGTTCTA	TAATTGCAGC	AGATGCATCT	3650
	GAGGTTTACA	CGGAGAGCTT	CCATTCCTTA	CCATCCTCTC	ATTCCTTAAC	3700
	TCTAATGTGA	TACAGGTTCT	ATTCTCACCA	TTCTATGAAC	AAAAGAGCAG	3750
25	CTGATTTACA	GGTTGGATTT	TTCAAAAAAA	AAAATTTCTT	TACCAGGATC	3800
	CCAAATGTAA	CAAAGGGTCA	ATATAGAAAA	CTTAAAAAGC	ACAGCCAAAAG	3850
	AGAAATATAC	ATAAGCCTTT	CAACTATTAA	TTTTGATTAA	TATCCAACGA	3900
	ATCTCTTTTT	AAGTGTATCA	ATATATTATT	CATTTTAATA	AAAGAAATTG	3950
	CAAGAGGCAC	TTGCTTTTTT	TGCTTACAAA	TACGGTTTCT	CAAATCGATT	4000
30	TTTTTTATAT	ACTGTTTGCA	TAGAATTTCA	ATCCATAAAG	CTACCTATTG	4050

5 AAAATTCCTT ATATTCTGC TAAACACTTA AGGGCTTATA TTTTCTCCAA 4100
ATTTATACAT CCTTGCTCAC AGTTCTGACG ATGTCTTTGG GATAAACTCT 4150
AAATGGAAGT AGAGGTTTAA AAGTTATGTC CATTTAAAAC TTTTAACACA 4200
AAAAAAGGTA AGTTAAAAAG TAAAAGTTTG GGGAGGCTGC TGGTCGCCCC 4250
CCCAACATTG GCTGACATTT TTATTCTTTG ACAACAAATA GGAAGAAAAT 4300
GTCAATGTCT TTTTTTACTG CTTAATACTG GTCATGTTAC TTTTCTTTCC 4350
TTTTGCTAAT CATAAGGCT TACTCACAAC TCTACAAAAA AATCTTACTC 4400
ATTCCTAATG TTCCTTCATT GAGAGATTGG TTTGCCGGAA ACGTTCTCAC 4450
TCTCACCAAG TCCCAACAGT CCCAACTCTA ACGACGGTCG CTGCTTCCAG 4500
10 AAATACGGCA CTTAAGGCAC CCTCGTCCTT ACCTTTTTCA TGCATGTGTA 4550
TTTCATTTTC AATAAAACAT TGAGTTGTTT CAAGGCCAGA CCATAGAGTT 4600
GAGCCCCAAC ATGCTAGTGG CCCAGTGTGA TGTAAATAATT TACCTTCCCA 4650
GGGGTCCTCT CCGGGGGGGT ACAGGCGAGA CTAAGTGACT TTAAGCTGTT 4700
GGGAGAACAA TGGCCAAACC TTTCGTGATT TTGAAATCTA TCAGGCCACG 4750
15 AGACACTTCG GTAGCGGACG CTCAACCCTG GGAATCCCAA CTATTGTCCC 4800
AAATTTTGCC TGAATCGTGC CAAAGATTGA GCCAGGGCCC GGGTGTCCAG 4850
GCAGTCTGCA GTGCCCCAGT CCCACCAGA GCCCTGAAGG GTGTGGGGCC 4900
CCACGAAACC GCTGCCCCGG CTCTAGGGTT TCTGTTTTCA GGTGCTGCG 4950
CTTTATTCTC TAATTCAGCG TTCCCGAAAG AGACCATGAG GACCCGCCCC 5000
20 GTGTCTTTTA CACCTTCCCG TGTCGGGTGG CGACAGCTGT TTACGAAGAA 5050
GAGTGCACCA CCCTTTCCCG CAAGCCGCAG CGGTTAGTTC CGCAGAAGGA 5100
GGAGCCAGGG CGTCGGGGCC CAGCTGGGAG AGAGGCCCGG CAGCGGGCGC 5150
CGCGGAGCAG CAAGGGCGTC CCTCTCTCGG CCGGAGCCCC GCGCGCCCCC 5200
GCCCCACGG CCGCGCCTTG CGGCCCCGCC ATTGGCTCCG CCGGGCCCTG 5250
25 GAGTCACTCC CTAGAGCCAC TTCCGCCAG GCGGGGGCCC AGGCCACGCC 5300
CACTGGCCTG ACCGCGCGGG AGGCTCCCGG AGACCGTGGA TTCTTACTCC 5350
TGCTGTGCGA ACTCGAAGAG GTCTCCGCTA GGCTGGTGTC GGGTTACCTG 5400
CTCATCTTCC CGAAAAATG 5418

請求の範囲

1. ヒトの補体制御因子 (DAF/CD55) の遺伝子を有し、当該ヒトの補体制御因子を臓器・組織に発現しているヒト以外のトランスジェニック哺乳動物。

5 2. ヒトの補体制御因子 (DAF/CD55) を血管内皮細胞に発現している請求項 1 記載のトランスジェニック哺乳動物。

3. ヒトの補体制御因子 (DAF/CD55) を全臓器・組織の血管内皮細胞に発現している請求項 1 又は 2 記載のトランスジェニック哺乳動物。

10 4. ヒトの補体制御因子 (DAF/CD55) の遺伝子上流側にブタ補体制御因子 (pMCP) プロモーターを有する請求項 1～3 の何れかに記載のトランスジェニック哺乳動物。

5. ブタ補体制御因子 (pMCP) プロモーターが、配列番号 1 に示される塩基配列又はその一部である請求項 4 記載のトランスジェニック哺乳動物。

15 6. トランスジェニック哺乳動物が、家畜又は実験動物である請求項 1～5 の何れかに記載のトランスジェニック哺乳動物。

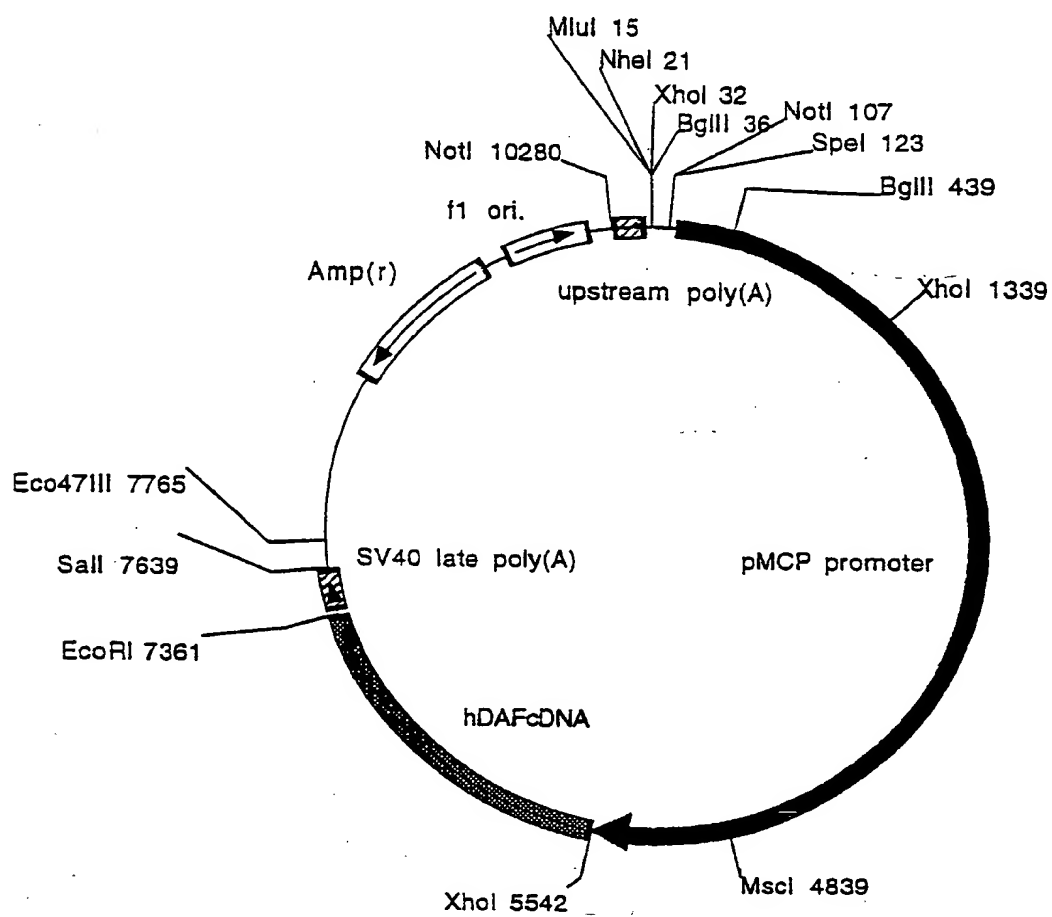
7. トランスジェニック哺乳動物が、トランスジェニックブタ又はトランスジェニックマウスである請求項 6 記載のトランスジェニック哺乳動物。

20

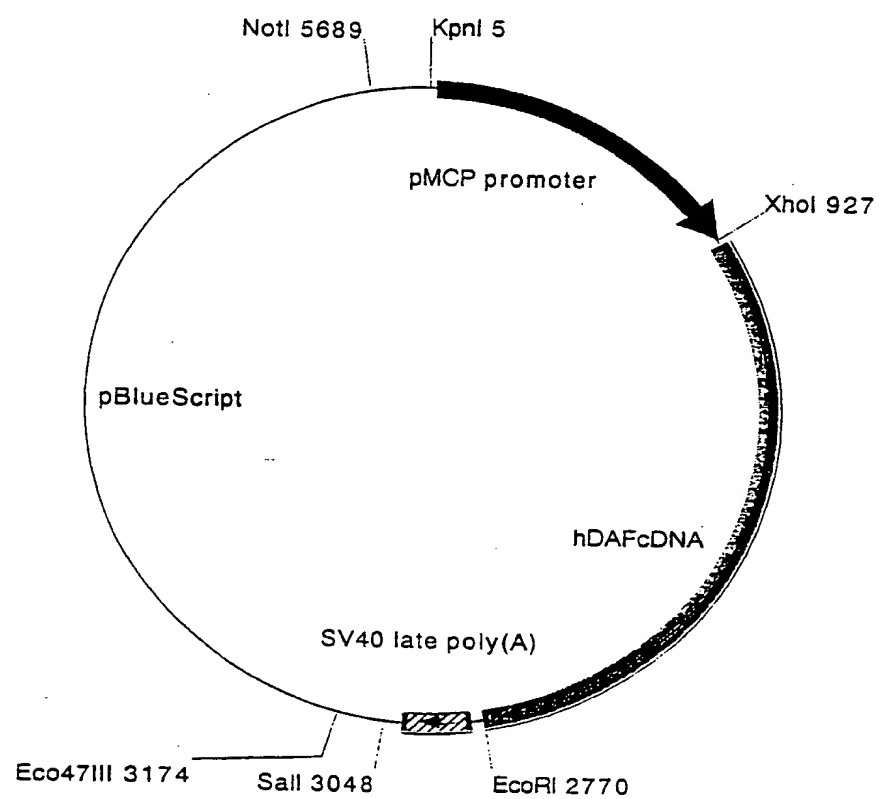
25

30

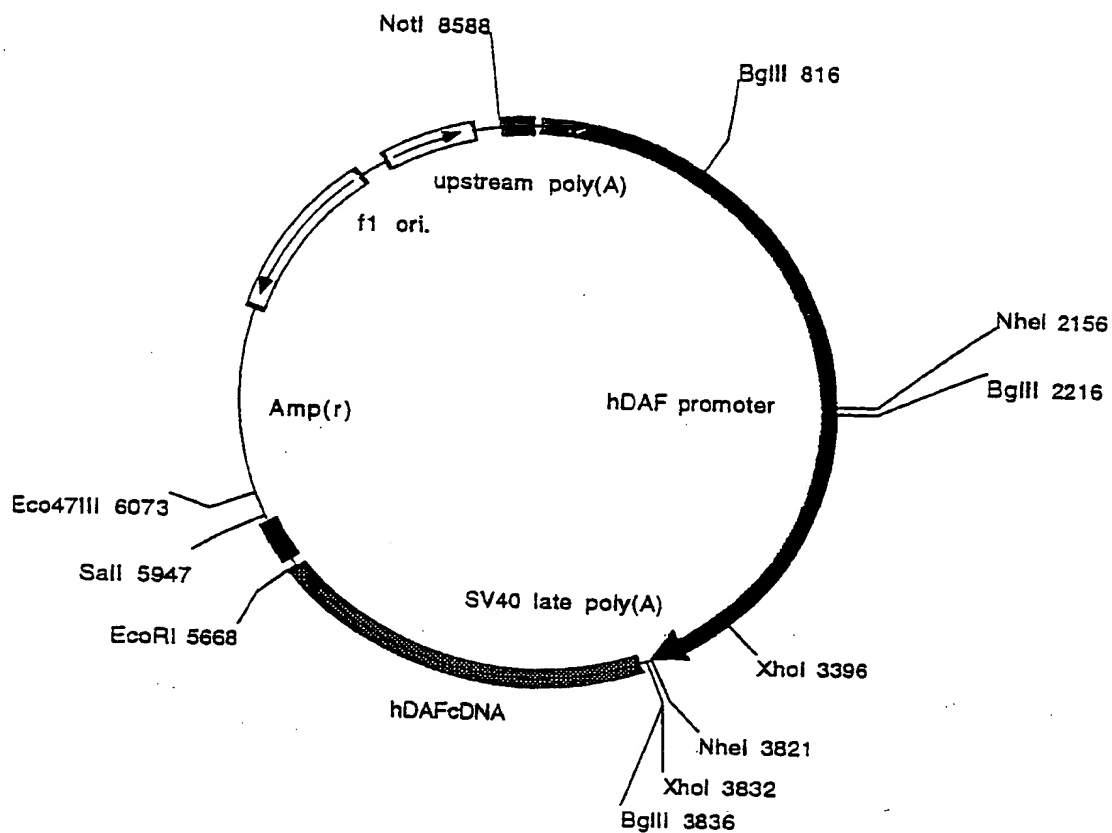




2



3



4 / 6

☒ 4

1 2 3 4



☒ 5

B H K LiLuS T

(A)



B H K LiLuS T

(B)



B H K LiLuS T

(C)



K562

図 6

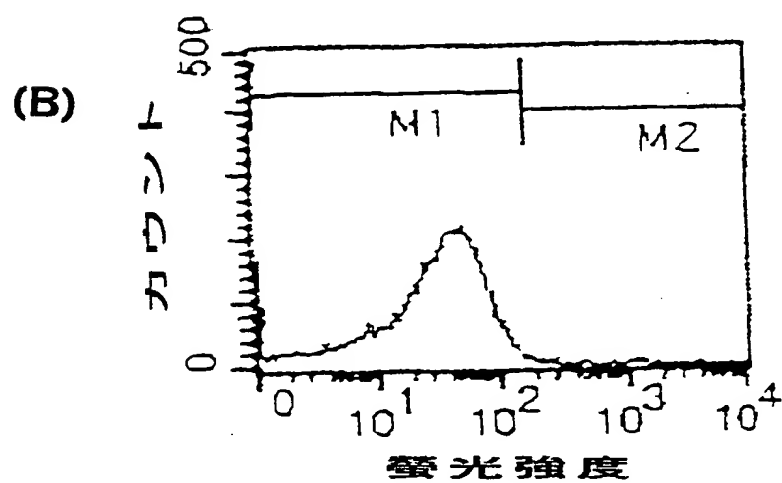
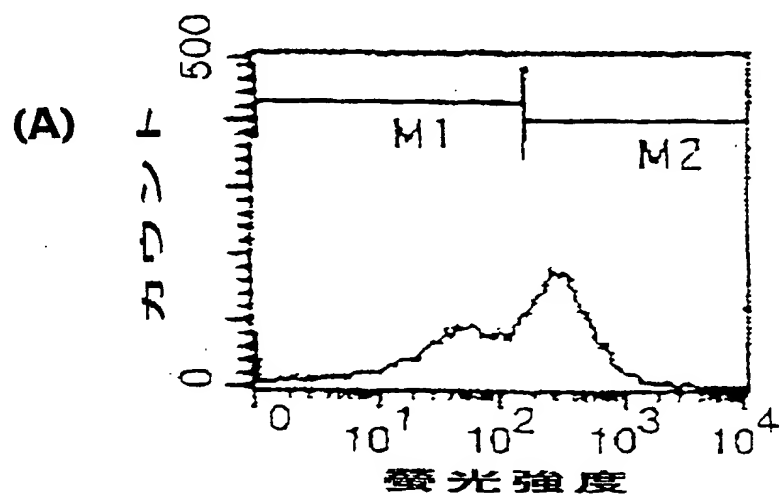
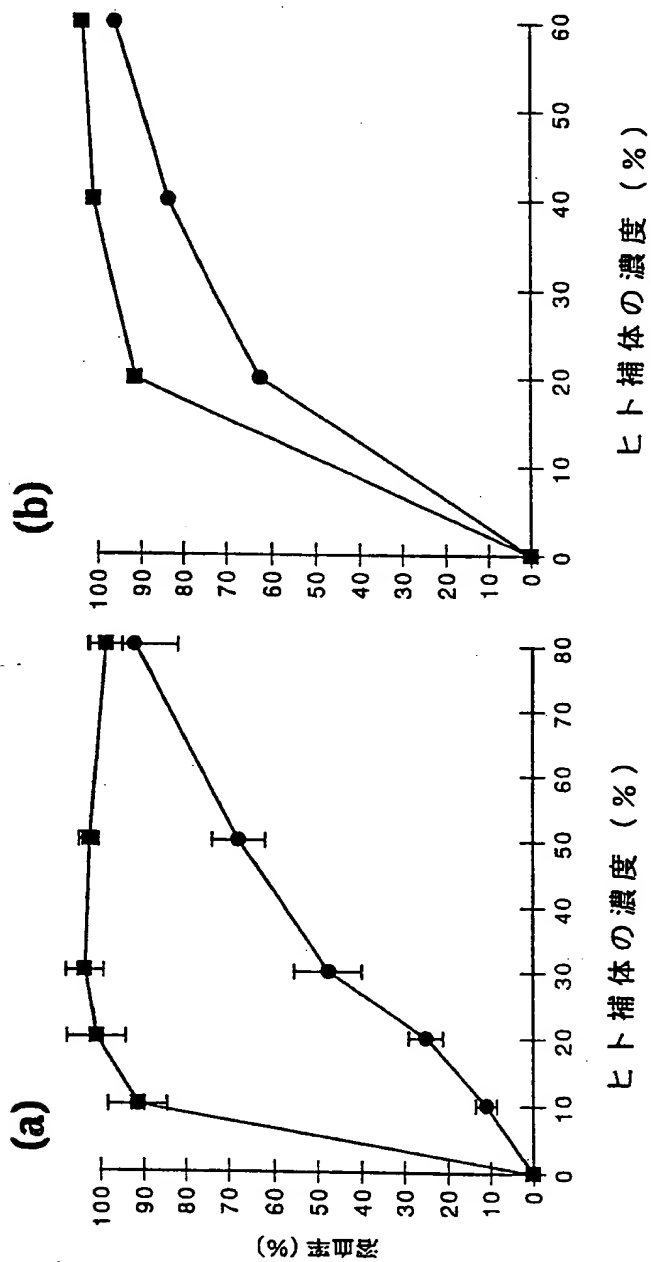


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/02927

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), JICST File (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Masaru Okabe, "Development of Transgenic Mice wherein Human Complement Control Factor has been expressed, in fisical 1995, Preparation of Experimental Models to be used in Common among Heterografting, Virus Receptor and Reproduction Immunity, No. 06454718 (in Japanese)", (Japan) (23. 04. 96)	1-3, 6, 7
Y	Full text	4
X	Shuji Hayashi, "Collection of Research Results of Prize Winners awarded with Kanae Bounty for Medical Science and Kanae Great in Aid of Medical Science (in Japanese)", Vol. 23, (Japan), (1996)	1-3, 6, 7
Y	Full text	4
Y	"Strides of Medicine", Vol. 176, No. 7, (1996), p.444-445	1-3, 6, 7
Y	"Strides of Medicine", Vol. 170, No. 9, (1994), p.744-745	1-3, 6, 7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
30 October, 1998 (30. 10. 98)

Date of mailing of the international search report
10 November, 1998 (10. 11. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl^o A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

JICSTファイル (JOIS)

GenBank

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	岡部勝「ヒト補体制御因子を発現したトランスジェニックマウスの開発、平成7年度、異種移植、ウイルスレセプター、生殖免疫に共通する実験モデルの作成、No. 06454718」(日) (23. 04. 96) 全文 全文	1-3, 6, 7 4
X Y	林衆治「かなえ医学奨励金かなえ医学助成金受賞者研究業績集」第23巻、(日)、(1996) 全文 全文	1-3, 6, 7 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 10. 98

国際調査報告の発送日

06.01.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

関根 裕

2B

9414

電話番号 03-3581-1101 内線 3238

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	「医学のあゆみ」, Vol. 176, No. 7, (1996), p. 444-445	1-3, 6, 7
Y	「医学のあゆみ」, Vol. 170, No. 9, (1994), p. 744-745	1-3, 6, 7



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 NH-6-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP98/02927	国際出願日 (日.月.年) 30.06.98	優先日 (日.月.年) 14.07.97
出願人(氏名又は名称) 日本ハム株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 1 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 5 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

当庁で読みとり可能なフォーマットの、配列表のコードデータを記録した F D が、国際調査報告の期限までに提出されなかった。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしが期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)
JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	岡部勝「ヒト補体制御因子を発現したトランスジェニックマウスの開発、平成7年度、異種移植、ウイルスレセプター、生殖免疫に共通する実験モデルの作成、No. 06454718」(日) (23, 04, 96) 全文 全文	1-3, 6, 7 4, 5
X Y	林衆治「かなえ医学奨励金かなえ医学助成金受賞者研究業績集」第23巻、(日)、(1996) 全文 全文	1-3, 6, 7 4, 5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 10. 98

国際調査報告の発送日

10.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

関根 裕

2B

9414

電話番号 03-3581-1101 内線 3238

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	「医学のあゆみ」, Vol. 176, No. 7, (1996), p. 444-445	1-3, 6, 7
Y	「医学のあゆみ」, Vol. 170, No. 9, (1994), p. 744-745	1-3, 6, 7

異種移植と補体

岡田秀親／名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体高分子部門

キーワード：補体、種特異性、DAF、MCP、HRF20 (CD59)

アメリカではヒトの肝を重症の肝不全の患者に移植し、話題になった。ヒトからヒトへの移植でも、免疫学的拒否反応の制御が容易ではないのに、異種動物からの移植となれば、さらに強い拒否反応を受け、その制御がさらに難しいものになると思われる。

しかし、生体の免疫反応を整理して考えてみると、同種移植の場合と異種移植の場合とでは免疫反応は質的に異なったものであるとみなすことができる。同種移植に対する免疫反応の主役はTリンパ球であり、これは本来は自己細胞が異端化したときそれを排除するシステムである。すなわち、細胞の遺伝子あるいはその発現のシステムに異常をきたして癌化したり、ウイルス感染により異常になったものは、本来は自己細胞であったものを個体の統制を維持するために排除するわけである。T細胞はMHC (major histocompatibility complex) を指標にして、そこにトラップされた異常ペプチドの存在で排除反応を開始する役割を担っている。同種の細胞のMHCは自己細胞のMHCとは微妙な違いがあり、自己細胞のMHCに異常なペプチドが組み込まれたものに類似したものとしてT細胞のレセプター (TCR) に認識されることができると考えられる。すなわち、同種移植された細胞は異端化した自己細胞に対するT細胞の排除反応に類した攻撃を受けると理解できるだろう。

このように、異端化細胞や同種移植細胞に対する排除反応にはMHCの介在が必須であり、MHC分子が存在しないとT細胞による排除反応

が起こらない。胎児の組織に由来する胎盤は母体の子宮壁に生着し、同種移植の状況になっているが母体側からの免疫学的拒絶反応を受けない。胎盤の母体に接する部分のトロフォブラストなどにMHC分子の発現がないためにT細胞による排除反応が起こらないと考えられる。

このようにMHC分子の認識がT細胞の反応に必要なとすると、MHC分子がまったく異なる異種動物の細胞にはT細胞による排除反応は起こらないと期待できる。しかし、異種移植を行うと10分もたたないうちに急性の拒絶反応が起こりはじめる。この拒絶反応はT細胞によるものではなく、自然抗体や補体の反応によって惹起されることが明らかである。補体反応が起これば、補体成分フラグメントのC5aやC3aなども形成され (これらはアナフィラトキシンともよばれる)、それらにより血管の透過性が高められるとともに、血管内皮細胞や白血球が刺激される。C5aには好中球を局所に集積させる好中球遊走活性 (chemotactic activity) もある。したがって、補体活性化によってその局所に急性炎症病態が形成されることになる。

ここで注目したい点は、このような補体反応は異種細胞に対して起こるが、同種細胞に対しては起こりにくいことである。そもそも補体は生体内に侵入してきた異物を察知し、それを排除するシステムである。この場合、抗体の存在はかならずしも必要ではなく、補体系だけでも侵入異物を察知し反応することができる。すなわち、補体系自体が自己と侵入異物とも識別する仕組みをもっているわけである。その基本原理は、自己細胞膜上に存在する同種特異的補体制御膜因子が自己補体の反応を防ぐために自己細胞には補体反応が起こらず、それが存在しない異物に対しては自由に補

体反応が起こることである。したがって、自己抗体が反応してクームス試験強陽性の赤血球も体内で補体反応による溶血反応を起こさないのも、同種特異的補体制御膜因子によって補体反応が防がれるためであると理解できる。

抗体反応がなくても、補体系の第二経路 (alternative complement pathway: ACP) によって常時自動活性化を起こしており、血漿中の制御因子とともに同種特異的補体制御膜因子によって補体の拡大反応が阻止された状態になっている。したがって、種特異的補体制御膜因子を持たない侵入異物があると自動活性化した補体反応が拡大し、異物に対する反応が強力に起こる仕組みになっているわけである。

ヒトの同種特異的補体制御膜因子としては DAF (decay accelerating factor), MCP (membrane cofactor protein), および HRF 20 (20 kDa homologous restriction factor: CD59) が同定され、それらの cDNA もクローニングされている。したがって、これらの遺伝子を異種動物に導入し、トランスジェニック動物として細胞表面に発現させることも技術的には可能である。

DAF, MCP, HRF20 などのヒトの同種特異的補体制御膜因子をブタなどの動物に導入して発現させれば、その動物の細胞や組織はヒト補体の反

応を防ぐはずである。この場合、異種動物の MHC はヒトのそれとはまったく異なるために、T細胞による排除を受けにくいことも期待できるとするなら、トランスジェニック動物の臓器がヒトに生着する可能性を期待することができる。すくなくとも、緊急に皮膚移植を必要とする全身火傷患者の救命などに成果が期待できるであろう。

しかし、トランスジェニック動物の臓器を長期にわたって移植生着させるためには解決しなければならない問題点もある。その第1は異種臓器の産生する蛋白因子に対する抗体の産生である。抗体が産生されれば蛋白因子の機能が中和されるとともに、免疫複合体が多量に形成され、腎その他に immune complex による異常病態も引き起こす恐れがある。

いずれにしても、火傷に対する一時的な移植には大きな期待があるので、DAF, MCP, HRF20 などの遺伝子を導入したトランスジェニックブタの作製はイギリス、アメリカ、そして日本でも研究が展開されており、DAF についてはイギリスの White 博士らのグループで一応の作製に成功している。しかし、まだその発現が十分ではなく、実用化可能なトランスジェニックブタの作製で先陣争いが進行中である。

話 題

異種移植と補体制御因子

宮川周士／大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター臓器制御部門臓器移植研究部

キーワード：異種移植，補体制御因子，超急性拒絶反応，alternative pathway，自然抗体

最近，異種移植が話題にされるようになった。異種移植は通常 concordant と discordant に分類され，前者では移植された graft は拒絶されるのに数日かかるのに対して，後者では超急性拒絶反応 (hyperacute rejection) が起こり，分単位で拒絶される。この反応は以前は宿主 (host) のもつ自然抗体と補体 classical pathway による反応と単純に理解されていた。ところが，補体学の進歩により，補体は生物にとって初期からある免疫系のひとつであることがわかってきた。つまり補体制御因子 (CRP) が自己細胞膜上にあることで自己補体からの攻撃を回避しており，ここには種特異性が存在している¹⁾。

■ graft での反応

異種の graft が移植されると，host の血が流れ込み，自然抗体および補体の攻撃がはじまる。自然抗体および補体の反応は graft-host の組合せにより異なる。

モルモット-ラットの場合：モルモットやラットの種類にもよるが，一般には自然抗体は弱く，逆にモルモットの細胞膜はラットの補体を直接活性化する。そしてモルモットの細胞性補体制御因子は種差のためラットの補体を制御できず alternative pathway が動き出す。おそらくは血管内皮を最初の target として破壊し，補体および血球系の血管外漏出が起こり，実質臓器細胞をも破壊する (図 1)²⁾。

ブタ-ヒトの場合：ヒトは糖鎖修飾酵素 $\alpha 1, 3$ galactosyl transferase に point mutation が入り pseudogene になっているため，逆にこの産物である Gal $\alpha 1-3$ Gal に対して自然抗体をもってい



図 1 モルモット-ラット間腹部異所性心移植後 20 分の組織像 (H-E 染色)

る³⁾。ブタ-ヒト間の自然抗体はこれだけでは説明できないが，かなり強い。一方，ブタの細胞膜はヒトの補体を直接活性化しないため，この系では classical pathway がおもに動き出すことになる。この場合も，ブタの細胞性補体制御因子は種差のためヒトの補体を制御できないと考えられる³⁾。

このほかの組合せでは，同じく自然抗体の強さ，補体の直接的な反応性，補体制御因子の作用という要因が入り交じり，いろいろな型で拒絶反応が起こると考えられる。

■細胞性補体制御因子

細胞性補体制御因子は C3 ステップで補体の攻撃を抑える因子と，膜侵襲複合体の形成を抑える

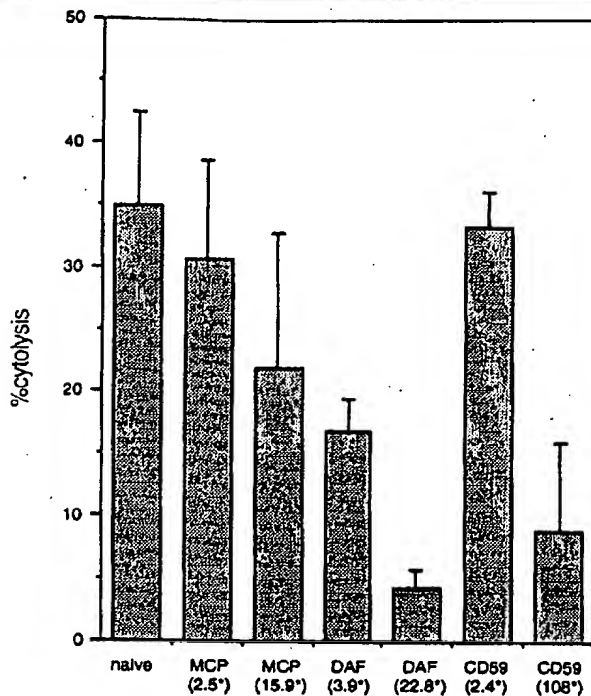


図2 各種ヒト補体制御因子を発現したブタ血管内皮細胞に40%正常ヒト血清(自然抗体および補体含有)を2時間反応させたときの細胞障害率
*: flowcytometryでの補体制御因子の発現量(mean shift値)を示す。

因子に分かれている。C3ステップの因子である細胞性補体制御因子はヒトではMCP(membran cofactor protein; CD46), とDAF(decay accelerating factor; CD55)がよく知られており, その補体制御機能に種差が存在すると考えられているが, 現在, 他の動物のMCPやDAFに相当する分子が同定されつつあるところである。

一方, CD59に関してはあまり種差を認めないとの報告がある⁴⁾が, ブタの血管内皮はヒト補体

のC8までで侵襲を受けるため存在するブタのCD59相当分子はあまりその機能を発揮できずにいる⁵⁾。

それぞれの作用はMCP(CD46)は血清中のFactor Iと協力してC3bを分解不活化する。DAF(CD55)は2分子集合体のC3コンバーターゼを可逆的に解離しC3コンバーターゼ形成を阻害する。CD59はC8とC9に結合して膜侵襲複合体の形成を阻害する。

■異種移植の臨床への応用

異種移植の研究はこの超急性拒絶反応のため最近まで手つかずの状態にあったが, 著者らが宿主の補体とgraftの補体制御因子の種差を問題にした¹⁾のをきっかけとしてヒト補体制御因子を移植臓器に取り入れる研究がはじまり, アメリカ, イギリス, オーストラリアではトランスジェニックブタの作成が現在進められている。

ヒト補体制御因子の異種細胞上での機能は多くの研究機関において確かめられている。著者らはC3ステップでの補体制御が必要と考え, CD55(DAF)がより有効とした²⁾が, CD46(MCP)もalternative pathwayに有効であり, ブタ→ヒト間の移植においても, 長期には重要であると考えている。

- 1) Miyagawa, S. et al.: *Transplantation*. 46: 825-830, 1988.
- 2) Galili, U.: *Immunol. Today*. 14: 480-482, 1993.
- 3) Miyagawa, S. et al.: *Transplantation*. 58: 834-840, 1994.
- 4) Carmen, W. et al.: *J. Immunol.* 152: 4095-4101, 1994.
- 5) Miyagawa, S. et al.: *Scand. J. Immunol.* (in press)

ヒト補体制御因子を発現したトランスジェニック マウスの開発

—異種移植、ウイルスレセプター、生殖免疫に共通する
実験モデルの作成—

(課題番号 06454718)

平成7年度科学研究費補助金 (一般研究(B))
研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 岡部 勝
(大阪大学微生物病研究所)

はしがき

本研究課題は平成 6-7 年度の 2 年にわたり以下に記す研究組織、研究経費によって行われ、ヒト補体制御因子を発現したトランスジェニックマウスの開発に必要な知見が得られた。

1. 研究課題 : ヒト補体制御因子を発現したトランスジェニックマウスの開発 —異種移植、ウイルスレセプター、生殖免疫に共通する実験モデルの作成—
2. 課題番号 : 06454718
3. 標題 : 平成 6-7 年度 (一般研究 (B))
4. 研究代表者 : 岡部 勝 (大阪大学・微生物病研究所・助教授)
5. 研究分担者 : 西宗義武 (大阪大学・微生物病研究所・教授)
瀬谷 司 (大阪府立成人病センター第 6 部・室長)
(研究者)
6. 研究経費 : 平成 6 年度 5, 100 千円
平成 7 年度 1, 000 千円
計 6, 100 千円

7. 研究発表

① 学会誌等

1. Ikawa, M., Kominami, K., Yoshimura, Y., Tanaka, K., Nishimune, Y., and Okabe, M. (1995). A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett.* 375, 125-128.
2. Ikawa, M., Kominami, K., Yoshimura, Y., Tanaka, K., Nishimune, Y., and Okabe, M. (1995). Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice. *Develop. Growth Differ.* 37, 455-459.
3. Iwata, K., Seya, T., Yanagi, Y., Pesando, J., Johnson, P., Okabe, M., Ueda, S., Ariga, H., and Nagasawa, S. (1995). Diversity of sites for measles virus binding and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein CD46. *J. Biol. Chem.* 270, 15148-15152.
4. Kitamura, M., Namiki, M., Matsumiya, K., Tanaka, K., Matsumoto, M., Hara, T., Kiyohara, H., Okabe, M., Okuyama, A., and Seya, T. (1995). Membrane cofactor protein (CD46) in seminal plasma is a prostasome-bound form with complement regulatory activity and measles virus neutralizing activity. *Immunology* 84, 626-632.
5. Ohashi, K., Saji, F., Wakimoto, A., Tsutsui, T., Nakazawa, T., Okabe, M., Mimura, T., and Tanizawa, O. (1994). Selection of acrosome-reacted sperm with MH61-Immunobeads. *Am. Soc. Androl.* 15, 78-82.
6. Watanabe, D., Okabe, M., Hamajima, N., Morita, T., Nishina, Y., and Nishimune, Y. (1995). Characterization of the testis-specific gene 'calmegin' promoter sequence and its activity defined by transgenic mouse experiments. *FEBS Lett.* 368, 509-512.
7. 岡部 勝 (1995). 受精と capacitation. *臨床科学* 8, 1035-1043.

② 口頭発表

1. S. Miyagawa, R. Shirakura, S. Nakata, H. Izutani, H. Matsuda, K. Iwata, S. Nagasawa, A. Terado, H. Natanaka, M. Matsumoto, and T. Seya.

Effect of transfected MACIF(CD59) on complement-mediated swine endothelial cell lysis, compared with those of membrane cofactor protein (CD46) and decay-accelerating factor(CD55).

XVth world congress of the transplantation society in Kyoto, Japan. August 28-September 2, 1994.

2. 補体制御因子による超急性拒絶反応の抑制

宮川周士、泉谷宏則、松田 暉、白倉良太、伊川正人、岡部 勝、寺戸敦子、松本美佐子、瀬谷 司。

日本移植学会(広島) 94年11月24-25

3. S. Miyagawa, Shirakura, S. Mikata, M. Tanemura, N. Fukushima, H. Matsuda, A. Terado, M. Hatanaka, M. Matsumoto, and T. Seya.

THE FUNCTIONAL FEATURE OF C5b-8 STEP LYSIS OF SWINE ENDOTHELIAL CELL TRANSFECTED CD59.

The third international congress for xenotransplantation in Boston, USA. September 27-October 1, 1995.

4. S. Miyagawa, M. Ikawa, K. Kominami, Y. Yoshimura, H. Tanaka, S. Mikata, R. Shirakura, H. Matsuda, Y. Yanagi, T. Seya, and M. Okabe.

DIFFERENCE OF EXPRESSION LEVELS BETWEEN GENE TECHNOLOGICAL PRODUCT : DCYT-MCP(CD46) AND INTACT MCP(CD46) IN TRANSGENIC MICE.

The third international congress for xenotransplantation in Boston, USA. September 27-October 1, 1995.

5. 宮川周士、白倉良太、島崎靖久、松田 暉、伊川正人、岡部 勝、寺戸敦子、松本美佐子、瀬谷 司

補体制御因子による超急性拒絶反応の抑制機序

日本外科学会(名古屋) 95年4月10-12

6. 宮川周士、三方彰喜、種村匡弘、泉谷裕則、福島教偉、松田 暉、岡部 勝、伊川正人、松本美佐子、瀬谷 司、白倉良太

超急性拒絶反応の制御

日本移植学会(京都) 9 5 年 9 月 4-6

7. 伊川 正人, 吉村 康秀, 小南 勝也, 岡部 勝. (1995). トランスジェニックマウス胚における GFP(green fluorescent protein) の発現. 哺乳動物卵子学会 (仙台市).

8. 伊川 正人, 小南 勝也, 吉村 康秀, 西宗 義武, 岡部 勝. (1995). GFP を利用したトランスジェニックマウス胚の選別. 日本分子生物学会年会 (名古屋市).

9. 岡部 勝. (1994). CD 46 と精子の受精能. 補体シンポジウム (北海道).

10. 岡部 勝, 伊川 正人, 小南 勝也, 吉村 康秀, 西宗 義武. (1995). GFP(green fluorescent protein)はトランスジェニックマウスでマーカー蛋白として有用である. 日本分子生物学会年会 (名古屋市).

11. 岡部 勝, 伊川 正人, 吉村 康秀, 小南 勝也. (1995). トランスジェニックマウスにおけるレポータージーンとしての green fluorescent protein(GFP). 日本実験動物学会総会 (横浜市).

12. 岡部 勝. (1995). シンポジウム 先体反応とアクロビーズテスト. 日本アンドロロジー学会 (東京都).

Okabe, M., Ikawa, M., Baba, T., and Nishimune, Y. (1996). PRODUCTION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) EXPRESSING TRANSGENIC MICE AND ITS APPLICATION IN THE STUDY OF SPERM ACROSOME REACTION. In European Testis Workshop (Oslo, Norway).

8. 研究成果

ヒト型の補体制御因子群を発現するマウスは臓器移植、ウイルス感染、受精などの分野で貴重な実験モデル動物となることを示すために以下の研究を行った。

I. 異種移植における超急性拒絶反応の抑制

臓器移植は単に心移植をとっても現在までに世界で 25000 例以上施行されており欧米ではすでに定着した医療である。しかし、ここ 3～4 年は各国ともドナー不足に悩まされている。異種移植はこのような時代の要請によるものである。

異種移植時にもっとも問題となるのは補体による超急性拒絶反応である。異種移植時に起こる超急性拒絶反応の研究は最近まで手つかずの状態にあったが、我々は世界に先駆けて、この現象が宿主の補体と移植片の補体制御因子の種差による不一致があるために生じる現象であることを明らかにしてきた。制御因子を発現させ補体の動きを止め、超急性拒絶反応がおこらない移植動物をマウスで作成することができれば、将来的には臨床応用として、トランスジェニックブタなどへの応用を試みることができる。

そこで、超急性拒絶を抑制するためにヒト補体制御因子を発現したマウスを作成し制御に有効な因子とその発現量を決定するために実験を行った。

1. ブタ赤血球上での補体制御因子の補体抑制効果

まず PI anchor 型ヒト補体制御因子 DAF(CD55)および CD59(MACIF, HRF20)をヒトの赤血球より抽出し、ブタ赤血球上での補体抑制効果を判定した。

DAF および CD59 をヒトの赤血球よりバイン処理後ブタノール抽出し、抗体カラムをもちいて精製した。10個のブタ赤血球に20%ヒト血清を EDTA 存在下で反応させ自然抗体感作後に、DAF および CD59 を1時間反応(incubation)させることによりこれら DAF、CD59 を膜上に発現させた。補体溶血活性の測定は、自然抗体を吸着したヒト血清とこれらの制御因子を発現したブタ赤血球を用い、classical pathway に関してはさらに Factor B を失活させ GVB 中で、alternative pathway に関して Mg++EGTA-GGVB 中にて行なった。

DAF は classical pathway を 35.2%、alternative pathway を 26.2%抑制したが、CD59 は classical pathway を 19.8%、alternative pathway を 0.8%しか抑制しなかった。

2. ブタ血管内皮上での補体抑制効果

次にブタ大動脈より血管内皮を cell line 化し、DAF 及び MCP さらに両者の hybrid の cDNA を作成し 発現 vector pME18s (SR alpha promoter) に組み込み、transfection することにより様々な clone を得た。これらの clone に 20% 及び 40% ヒト正常血清を反応させた。Classical pathway に関しては D-MEM 中で、alternative pathway に関しては Mg++EGTA-D-MEM 中にて補体抑制効果を LDH assay にて測定した。

ブタ血管内皮上では主に classical pathway が活性化され alternative pathway の活性化は弱かった。DAF の方が MCP より有効にヒト補体を抑制した。また DAF に関しては発現量によっては 80% 以上抑制が可能であった。

3. in vivo での補体制御因子の効果

in vivo での異種 graft 上の補体制御因子の反応をみるために、ブタでの実験の前段階として transgenic マウスを作成し in vivo での補体制御因子の作用の検討を試みている。

Construction としては pME18s (SR alpha promoter) 及び pCAGGS (chick beta actine promotor) に DAF 及び MCP の cDNA を挿入後 linear 化し、これを C57BL/6 の卵に injection することにより transgenic マウスを作成した。Founder は PCR 及び Southern blot にて確認し、pME18s/DAF を 1 line、pME18s/MCP を 6 line ほか、以下の表のようにトランスジェニックマウスを作成した。

Production of transgenic mouse lines			
promoter	coding-sequence	line number	expression
SR alpha promoter	MCP	TG 1	- (T, B cells)
		TG 2	- (T, B cells)
		TG 3	- (T, B cells)
		TG 4	- (T, B cells)
		TG 5	- (T, B cells)
		TG 6	- (T, B cells)
SR alpha promoter	DAF	TG 7	+/- (T, B cells)
beta-actin promoter	MCP	TG 8	- (T, B cells)
		TG 9	- (T, B cells)
		TG 10	- (T, B cells)
		TG 11	- (T, B cells)

		T G 12	- (T, B cells)
		T G 13	- (T, B cells)
		T G 14	- (T, B cells)
beta-actin promoter	deltaCYT-MCP	T G 15	+(muscle)
		T G 16	+(muscle)
		T G 17	+(muscle)
		T G 18	+(muscle)
beta-actin promoter	delta3'-MCP	T G 19	+(muscle)
		T G 20	+(muscle)
		T G 21	+(muscle)
		T G 22	+(muscle)
beta-actin promoter	DAF	T G 23	+/- (T,B cells)
		T G 24	+/- (T,B cells)
		T G 25	+/- (T,B cells)
		T G 26	+/- (T,B cells)
		T G 27	+/- (T,B cells)
		T G 28	+/- (T,B cells)
beta-actin promoter	delta3'-MCP+GFP	検索中	検索中
beta-actin promoter	MCP+GFP	検索中	検索中

血球についてはこれまでのところ強い発現を示すものが認められていない。これらの検討を通じてMCPの3'末端配列中に何らかのサイレンサーが含まれていることがあきらかになった。このサイレンサーは、上記のように、*in vitro*の系ではなんらサイレンサー活性を示さないが *trans gene* として *in vivo* に組み込まれると明らかに活性を示した。当初、この活性はMCPのcytosolic tailにあるのではないかと考えられたが、表にあるようにさらに3'末端をのばしたdelta 3'-MCPにおいても活性が認められたことから、3'非翻訳領域にその活性が特定された。

II. ウイルス感染の実験モデル実験としての応用

近年ウイルスレセプターに関する研究が進み、特に補体制御因子との関係が研究されつつある。EBウイルスはCR2(CD21)をレセプターとしているのは既知のことであるが、CD46(MCP)が麻疹ウイルスのレセプターであることが最近判明

した。また、補体制御因子に共通するドメインである SCR が herpes simplex, cytomegalo virus, vaccinia virus などにより carry されていることが報告されている。そこで、補体制御因子を発現するマウスを作成することでこれらのウイルスの *in vivo* での感染実験を行った。

in vivo の感染実験を行うことによりその、臓器別感染の状態、経路及び投票実験等多角的に取り組むことができる。MCP(CD46)を発現したマウスを用いて麻疹ウイルスの感染モデル動物ができあがれば意義は大きい。

I. に示したトランスジェニックマウス TG15~TG18 を用いて *in vivo* の感染実験を行いつつあるが、現在までのところ確実な感染のデータは得られていない。TG15~TG18 は MCP の細胞内ドメインを持っていないが、*in vitro* ではウイルスのレセプターとしての活性を有することが証明されている。現在は TG19-22 の細胞内ドメインを有する完全型の MCP を発現するトランスジェニックマウスが得られているのでより、自然に近い形での感染実験を続行中である。

ただ、これまでに得られた MCP を発現するトランスジェニックマウスのプロモータはいずれも beta-actin のプロモーターを使用しているので、必ずしも血球に強い発現が認められていない。そこで、human のゲノミックライブラリーから MCP プロモーターをクローニングする事を試み、成功した。

MCP プロモーターによって MCP を発現させることを試みつつあるので、これまでに得られた結果と併せて大きな進展が今後見込まれる。

III. 生殖免疫における受精現象の解明

近年、先進諸国では不妊が、開発途上国では避妊が社会問題としてとりあげられている。一方、生殖免疫の分野では卵と精子の接着反応のメカニズムは未だに十分には解明されていないのが現状である。ところが、最近の研究では補体制御因子の意図つである CD46(MCP)が精子の先体反応によって内先体膜に大量に表現され、また、卵胞液からは大量の C3 が産生されることが判明しており、さらに、卵子の細胞膜上には CD35(CR1), CD116/CD18(CR3) が表現されることも判明してきた。

マウスの精子及び卵子にこれら補体制御因子をトランスジェニック方で発現させ、これら接着におけるメカニズムを明らかにする。

補体制御因子を含む補体系が受精に関係していることは多くの研究者により報告されつつあるが実験動物では CD46(MCP)にあたる蛋白質はまだ、マウスにおいても同定されていない。逆にヒトの卵を使う実験は非常に難しいことよりこの分野が大きく立ち後れてきた。しかし、MCP や CR1 を発現したマウスを作成することで実験系を整えればこの分野に対する貢献度は非常に大きいと思われる。

る。

beta-actinのプロモーターを使用して得られたトランスジェニックマウスの卵子にはMCPが発現されていたが精子上には認められなかった。そこで、精子上に発現させるためにpromoterを別に選択する必要があった。

精子は体細胞と異なり、減数分裂を終え半数体になった特殊な細胞である。そこでの蛋白合成はhaploid expressionと呼ばれる特殊なpromoterに依存した発現によらなければならない。そこで、精子上に発現させるための予備試験としてacrosinのpromoterを試すことにした。promoter活性を知るためのマーカーとして、最近注目されているオワンクラゲ由来の発光蛋白質GFPを使用した。acrosinのpromoterにRS-GFPをつないでトランスジェニックマウスを作成したが得られた4ラインのすべてで発現が認められなかった。そこで、RS-GFPのN-末端にacrosinのシグナルペプチドとN-glucosylationサイトを導入したトランスジェニックマウスを作成したところ、予想通り精子のアクロソームにGFPが発現が認められた。しかし、われわれが、ヒト精子で証明したようにMCPは精子の内先体膜上に発現しており、先体反応を起こした精子で初めて抗原として露出される。acrosinと同じように半数体の細胞で発現されるprotaminのpromoterを用いてヒトCD4を発現させたところ確かに精子の膜上に発現されるが精子が成熟を行うときに不必要になる細胞質や細胞膜と一緒にresidual bodyのなかに捨てられることを見いだしている。今後、acrosin promoterに結合したmcpのトランスジェニックマウスを作成すると共に、先に述べたヒトMCPのプロモータに結合したMCPを発現させてより自然に近い形で、受精現象を観察することが望まれる。

いずれにしても、今回の検討で、精子上に目的の蛋白質を発現させるほうほうが見つかったので今後の発展が期待される。

Production of transgenic mouse lines

promoter	coding-sequence	line number	expression
acrosin promoter	RS-GFP	T G 49	- sperm
		T G 50	- sperm
		T G 51	- sperm
		T G 52	- sperm
acrosin promoter	acrosin-RS-GFP	T G 53	+ sperm acrosome

T G 54 + sperm acrosome
T G 55 + sperm acrosome
